

# **Marcadores precoces de la integración del genoma viral del Virus del Papiloma Humano: Utilidad de la detección del mRNA HPV E6/E7 en el Cribado del Cáncer de Cérvix y en el manejo de las Lesiones Preinvasivas.**



**Tesis Doctoral**

**María Pilar Cano Facenda**

**Universidad Autónoma Madrid**

**Directores Tesis: Dra. A Sáez Sáez, Dr. JM Bajo Arenas**



# AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias a la ayuda de muchas personas que me han acompañado a lo largo de todo este proyecto.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis el apoyo mostrado.

A la doctora Alicia Sáez, profesional excepcional, por guiarme todo este tiempo, aportar calma y sosiego, y tener siempre la puerta abierta para mí. Al doctor José Manuel Bajo, continuo referente en nuestra profesión, por animarme a embarcarme en este proyecto.

A la Unidad de Apoyo Metodológico del Hospital La Princesa, Lorena y Paco, por vuestra ayuda tan importante, por hacer sencillo lo difícil e introducirme en el mundo de la metodología científica.

A las enfermeras de mi consulta de Patología Cervical, Carmen y Raquel, hacéis una labor insustituible, vosotras que habéis estado todo este tiempo escuchando los devenires del día a día de esta tesis, siempre apoyando y ayudando en todo lo posible, haciendo más liviano el peso del trabajo.

A Fernanda, la trabajadora incansable, qué habría hecho sin tu ayuda. Gracias por tu infinita paciencia y tu sonrisa permanente.

A mis padres, ejemplo y modelo vital, los primeros que inculcaron en mí el espíritu de trabajo y esfuerzo, sin ellos no habría llegado hasta aquí. A mis hermanas, que siempre han creído en mí y desde la distancia me han apoyado.

A Alberto, pilar fundamental en mi vida, fuente inagotable de energía y optimismo, que ha estado siempre a mi lado, ayudándome a superar las dificultades. Gracias por tu cariño, por estar en los momentos difíciles y convertir los problemas en soluciones.

Mi más sincero agradecimiento a todos los que han colaborado de un modo u otro y han hecho posible este proyecto.



# GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**AGUS:** células glandulares atípicas de significado indeterminado

**ASCUS:** células escamosas atípicas de significado indeterminado

**ASC-H:** células escamosas atípicas sin poder descartar lesión de alto grado

**CIN:** neoplasia intraepitelial cervical

**CIS:** carcinoma in situ

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**E:** especificidad

**EEUU:** Estados Unidos

**HC2:** técnica de Captura de Híbridos 2

**HPV:** virus del papiloma humano (human papillomavirus)

**HPV-AR:** virus del papiloma humano de alto riesgo

**HPV-BR:** virus del papiloma humano de bajo riesgo

**HSIL:** lesión intraepitelial escamosa de alto grado

**IC:** intervalo de confianza

**INE:** Instituto Nacional de Estadística

**K:** índice de kappa

**Ki67:** marcador de proliferación

**LSIL:** lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

**mRNA:** ácido ribonucleico mensajero

**NK:** linfocitos Natural Killer

**p:** probabilidad

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**p16INK4a:** tinción inmunohistoquímica proteína 16

**p53:** proteína supresora de tumores

**Rb:** proteína retinoblastoma

**RNA:** ácido ribonucleico

**S:** sensibilidad

**UE:** Unión Europea

**VAIN:** neoplasia intraepitelial vaginal

**VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana

**VPP:** valor predictivo negativo

**VPN:** valor predictivo positivo

# **INDICE**

## **INTRODUCCIÓN**

- 1. Epidemiología: incidencia, mortalidad y supervivencia**
- 2. Causas y factores de riesgo**
- 3. Oncogénesis cervical por el Virus del Papiloma Humano**
  - 3.1. Transformación celular por Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (HPV-AR)**
  - 3.2. Oncogenes virales**
  - 3.3. Mecanismo de evasión tumoral, persistencia de la infección viral**
  - 3.4. Historia biológica de la infección por HPV y carcinogénesis**
  - 3.5. Genoma y Clasificación del HPV**
- 4. Cribado del cáncer de cérvix**
  - 4.1. Citología**
  - 4.2. Marcadores Moleculares**
    - 4.2.1. Test de Detección de DNA de HPV**
    - 4.2.2. Otros Marcadores Moleculares**
      - 4.2.2.1. Cuantificación de mRNA que codifica para las proteínas oncogénicas de los HPV de alto riesgo**
      - 4.2.2.2. Proteína p16INK4a**
      - 4.2.2.3. Tinción Dual p16/Ki67**
      - 4.2.2.4. Marcadores de Metilación. Epigenética**

## **OBJETIVOS**

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

- 1. Descripción del Estudio**
- 2. Criterios de selección de las pacientes**
- 3. Variables estudiadas**
- 4. Análisis Estadístico**

## **RESULTADOS**

- 1. Análisis Descriptivo**
- 2. Distribución de las lesiones**
- 3. Distribución de los tipos virales**
- 4. Resultados de los test de detección de HPV y tinción p16INK4a**
- 5. Comparación de técnicas previas al tratamiento**
- 6. Comparación de técnicas e histología de las lesiones**
- 7. Comparación de técnicas posteriores al tratamiento**

## **DISCUSIÓN**

- 1. Consideraciones sobre las características de la población a estudio**
- 2. Consideraciones sobre los hallazgos histológicos**
- 3. Consideraciones sobre la infección por HPV y tipos virales**
- 4. Consideraciones sobre los test diagnósticos**
- 5. Consideraciones sobre los resultados tras el tratamiento quirúrgico**

## **CONCLUSIONES**

## **BIBLIOGRAFÍA**



# INTRODUCCIÓN

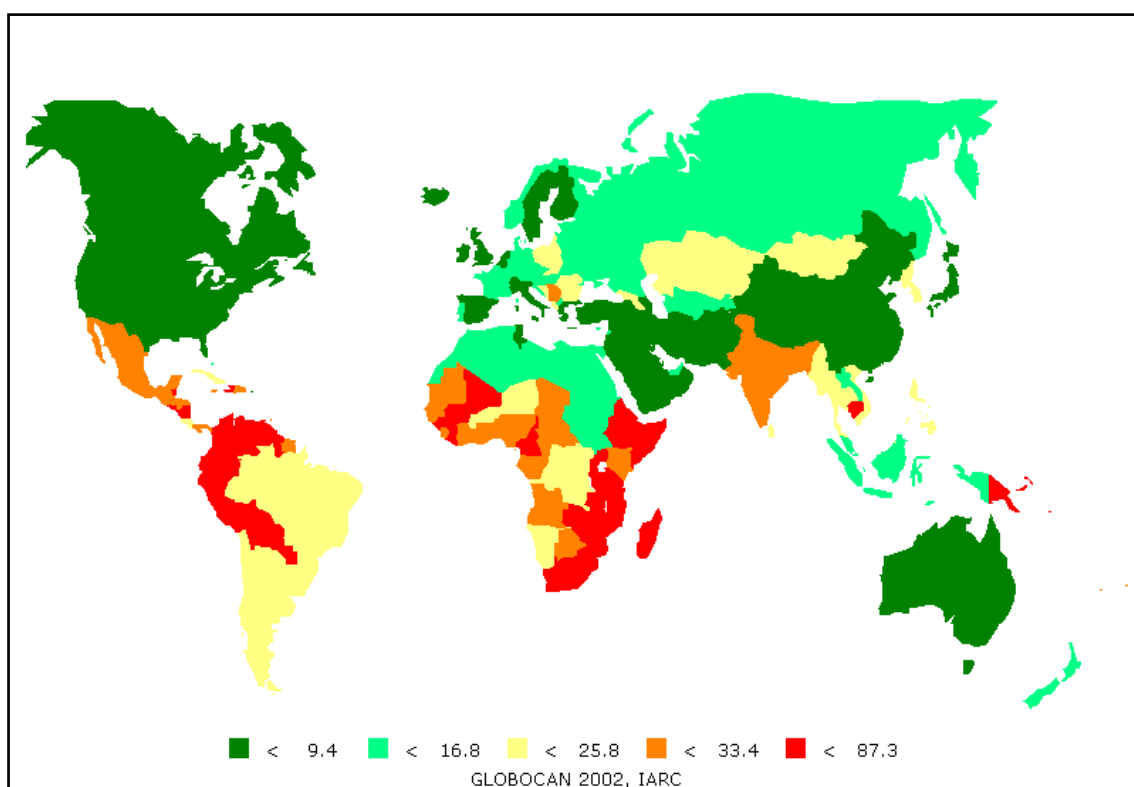
## 1. EPIDEMIOLOGÍA: incidencia, mortalidad y supervivencia.

Los programas de screening del cáncer de cérvix han reducido la incidencia y la mortalidad del cáncer de cuello uterino en aquellos países en los que se han implantado [1].

A pesar de ello, el cáncer de cérvix representa a nivel mundial el segundo cáncer más frecuente (tras el de mama), y la tercera causa de mortalidad por cáncer entre las mujeres [2].

Cada año se diagnostican 500.000 nuevos casos de cáncer de cérvix en el mundo, la mayoría de ellos en países en vías de desarrollo (Figura 1). Más del 85% de las muertes por esta causa ocurren en dichos países, donde constituye la principal causa de muerte por cáncer entre las mujeres jóvenes [3].

**Figura 1. Mapa de la Distribución mundial. Tasa de incidencia ajustada a la población mundial por 100.000 mujeres.**



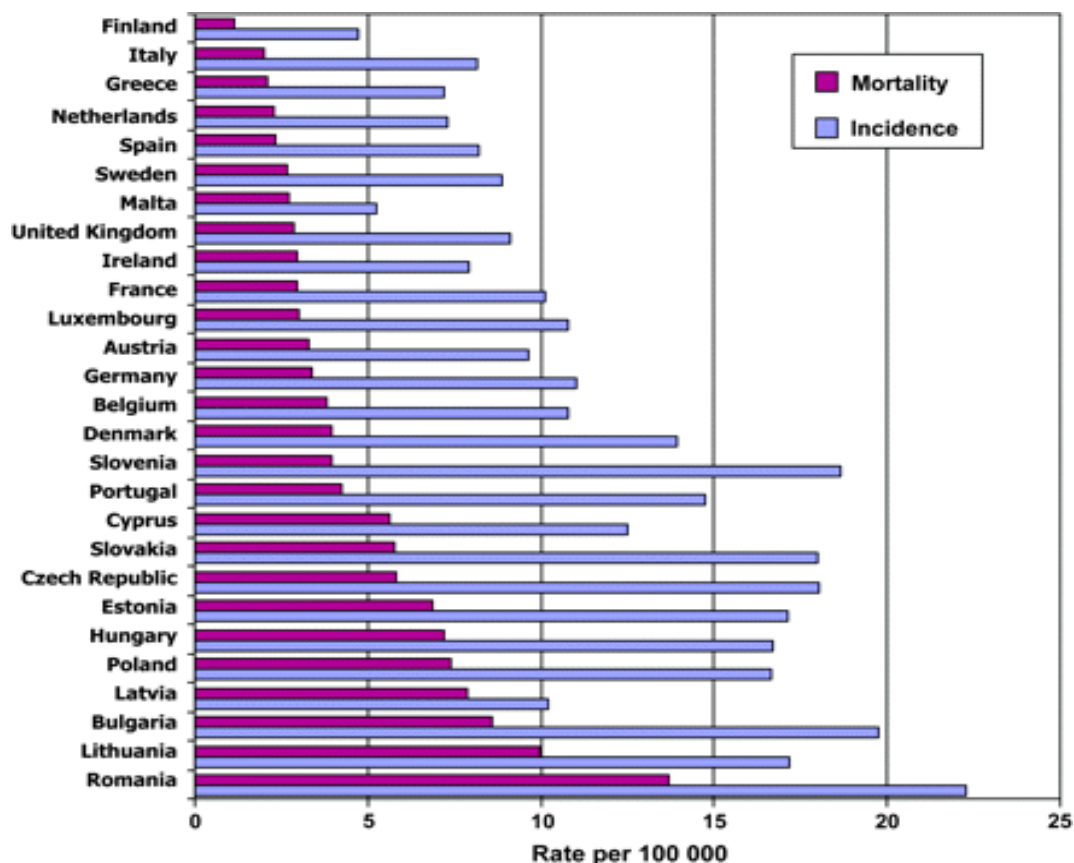
En Europa, la incidencia media es menor que en la mayoría de países de África, Sudamérica o Asia (menos de 15 casos/100.000 mujeres comparado con más de 30 casos/100.000 respectivamente).

Las tasas de incidencia son muy variables entre los distintos países de Europa, así pueden oscilar desde los 4,7 casos/100.000 mujeres en Finlandia y los 27,4 casos/100.000 mujeres en Serbia y Montenegro [4, 5].

En general las tasas más bajas se encuentran en los países del Norte de Europa, mientras que las más altas se observan en los países del Sur y Este de Europa, Serbia y Montenegro, Bosnia, Albania, Rumanía y Bulgaria.

En España la tasa de incidencia estimada es de unos 8,2 casos/100.000 mujeres, siendo una de las menores dentro de la Unión Europea, después de Finlandia, Malta, Grecia, Holanda e Irlanda [5,6]. (Figura 2).

**Figura 2. Tasas ajustadas de incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix en Europa (tasa ajustada a la población mundial por 100.000 mujeres).**



El cáncer de cérvix es responsable de unas 280.000 muertes en el mundo; un 85% de ellas en países en vías de desarrollo.

En la Unión Europea se estima que este tumor fue responsable de unas 16.000 muertes en el año 2004 [7].

España es uno de los países dentro de la UE con las tasas más bajas de mortalidad, unas 600 muertes en el año 2006 [8]. La tasa ajustada de mortalidad fue de 1,54 muertes/100.000 mujeres (tasa estandarizada por la población mundial).

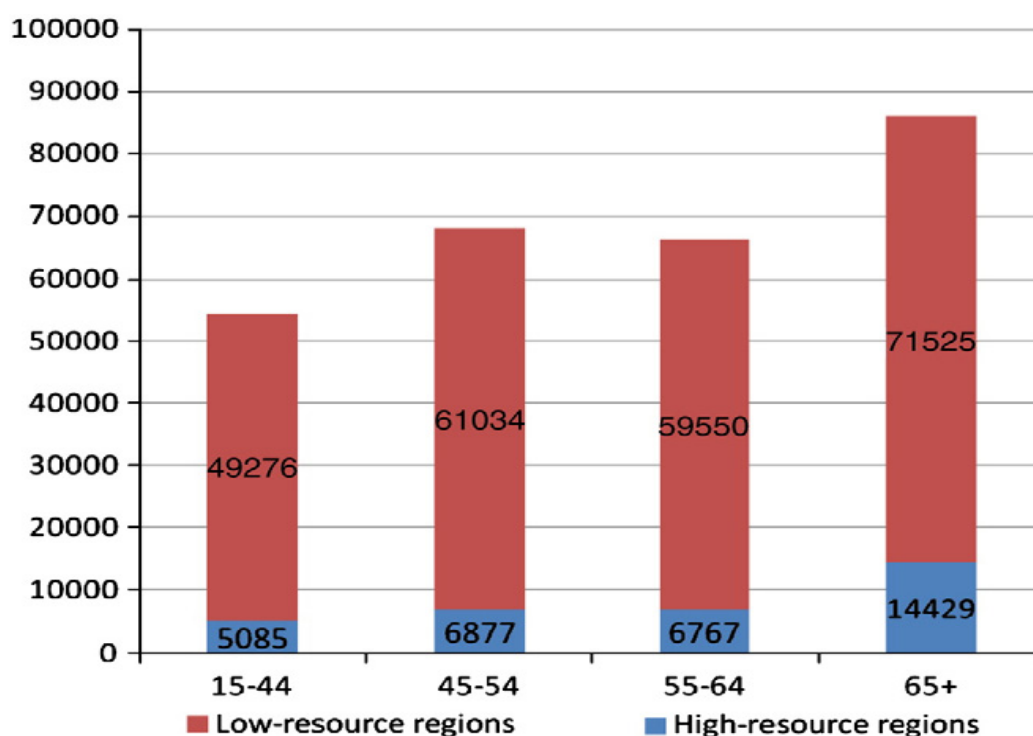
Dentro de España la tasa de mortalidad varía según las Comunidades Autónomas. Melilla tiene una de las mayores tasas (7,11 muertes/100.000 mujeres), seguida de Canarias, Asturias, Baleares y Galicia (3 muertes/100.000 habitantes entre los años 1996 y 2000) [8].

En la mayor parte de los países de la Unión Europea, las tasas de mortalidad por cáncer de cérvix han disminuido en las últimas décadas. Este descenso sin embargo ha sido menor en los países del Este, e incluso aumentó en algunos países (Bulgaria, Letonia, Lituania y Rumanía).

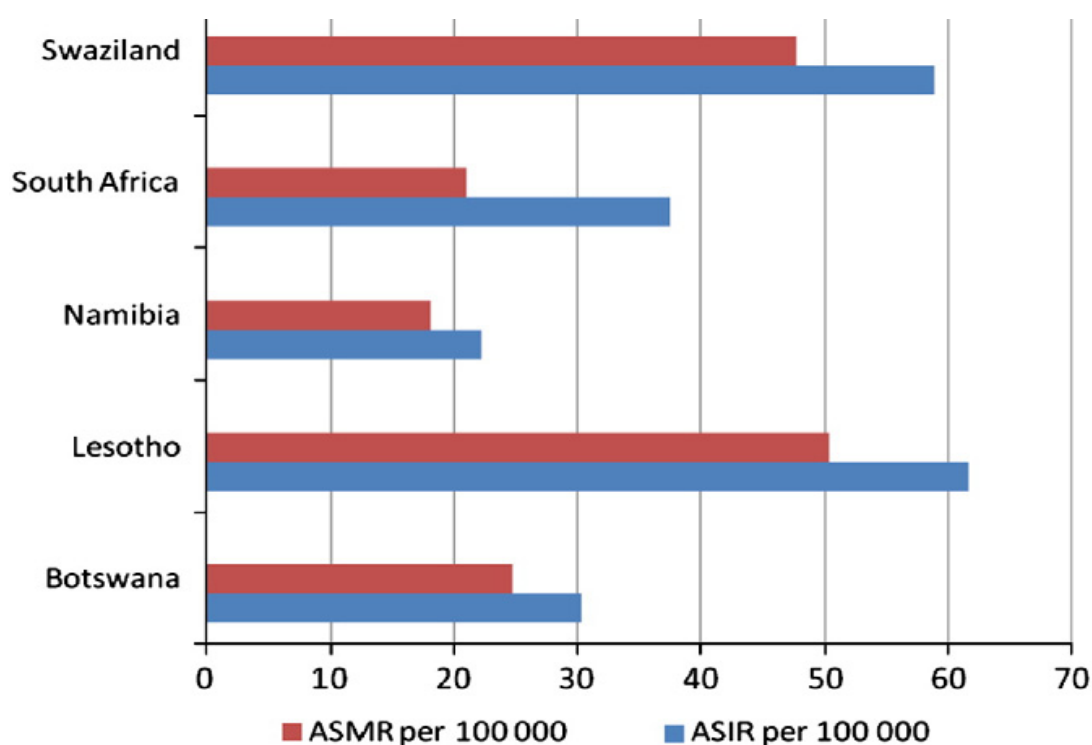
En general, la mortalidad sigue un patrón descendente en España entre los años 1975 y 2004, aunque hay importantes diferencias entre las CC. AA. Cataluña (Porcentaje de cambio anual de -4,55; intervalo de confianza [IC] del 95%: -4,85 a -4,23) y Navarra (PCA de -4,31; IC del 95%: -5,85 a 2,75) han mostrado una reducción más acusada en sus cifras de mortalidad; mientras que el menor descenso se observa en Madrid (PCA de -2,32; IC del 95%: -2,93 a 1,70), Canarias (PCA de -2,36; IC del 95%: -3,00 a -1,72) y Galicia (PCA de -2,60; IC del 95%: -3,07 a -2,10) [9]. Globalmente el porcentaje de cambio anual entre los años 1976 y 2002 fue de -4,9% IC 95% -6,2 a -3,6 [10].

Las tasas de supervivencia son muy variables a nivel mundial. Así en Estados Unidos la tasa de supervivencia a los 5 años se sitúa en torno al 72% [11], en Europa en el 63% [12] y en África la supervivencia a los 5 años supone sólo el 30,5% [13]. (Figuras 3 y 4).

**Figura 3. Número anual de muertes por cáncer de cérvix por grupos de edad según regiones de altos o bajos recursos.**



**Figura 4. Tasa de Incidencia estandarizada por edad por 100.000 (ASIR) y tasa de Mortalidad estandarizada por edad por 100.000 (ASMR)**



En Europa la supervivencia es variable entre los diferentes países, siendo significativamente mayor en los países del Norte y por el contrario sensiblemente menor en países como Polonia, Portugal o España [12].

La revisión de los datos aportados por casi 50 registros europeos entre los años 1988 y 1999 ha permitido analizar la evolución de la supervivencia a este tumor. Globalmente la supervivencia ha mejorado en toda Europa, pasando del 64,8% hasta el 66,1%. Aún así, cabe destacar que en los últimos años se ha producido una ligera disminución debida al incremento del riesgo observado entre las mujeres mayores [14].

## **2. CAUSAS Y FACTORES DE RIESGO**

Uno de los descubrimientos más importantes en la investigación etiológica del cáncer en los últimos 25 años ha sido la demostración de que la infección persistente por genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (HPV) representa el agente causal necesario para la aparición del cáncer de cuello uterino.

Esta afirmación está basada en una sólida evidencia epidemiológica así como en hallazgos experimentales [15, 16, 17, 18].

El papel etiológico de los genotipos de alto riesgo más frecuentes (como el 16 y 18) en el desarrollo de lesiones preinvasivas e invasivas ha sido demostrado en estudios clínicos, epidemiológicos y virológicos. El cáncer de cérvix es en realidad una secuela a largo plazo de una infección de transmisión sexual no resuelta por genotipos oncogénicos del HPV.

Se han descrito más de 200 tipos de HPV, que pueden clasificarse según su tropismo cutáneo o por mucosas.

Dentro de los tipos con tropismo por las mucosas alrededor de 40 genotipos infectan el tracto genital [19]. Estos han sido clasificados en función de su potencial oncogénico en alto riesgo y bajo riesgo.

Un análisis combinado de 12 estudios llevados a cabo en 25 países ha estimado la prevalencia específica de tipos de HPV en 3.085 casos de cáncer de cérvix [20].

Se aplicó un protocolo de estudio estandarizado y determinación de DNA del HPV con PCR GP5+/6+ en un laboratorio central. La prevalencia global de DNA del HPV fue del 96%.

Los 15 tipos más frecuentes fueron por este orden: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 51, 39, 68, 73 y 82 [20].

Se estima que los HPV 16 y 18 son responsables del 70% de los casos de cáncer de cuello uterino a nivel mundial y los ocho tipos más comunes son responsables del 89% de los casos.

En un exhaustivo meta-análisis de 85 estudios, incluyendo la serie publicada por la International Agency for Research on Cancer (IARC), se contabilizaron 10.058 casos de cáncer de cérvix [20]. Dicho meta-análisis ha sido actualizado recientemente hasta llegar a los 14.500 casos (procedentes de estudios publicados hasta 2006)

Los tipos de HPV identificados con mayor frecuencia fueron en orden decreciente de prevalencia: 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 51, 39, 6, 73, 68 y 82. Igualmente los genotipos 16 y 18 son responsables del 70% de los casos de cáncer y los 8 tipos más frecuentes de hasta el 90% de los casos.

Por tanto se obtuvieron hallazgos coherentes entre el análisis combinado de la IARC y el meta-análisis.

El meta-análisis muestra que la distribución de tipos de HPV no varía mucho entre los distintos tipos de cáncer de cuello uterino (carcinoma escamoso y adenocarcinoma). Los tipos 16 y 18 son los más frecuentes en ambos tipos histológicos, sin embargo el HPV 18 adquiere mayor importancia en el adenocarcinoma que en el carcinoma escamoso.

A continuación se muestran unas tablas donde se reflejan los genotipos de HPV más prevalentes hallados en mujeres con citología normal, lesiones cervicales de bajo grado, lesiones cervicales de alto grado y en el cáncer de cérvix en el mundo, Europa y España [22].

**Figura 5. Distribución de los tipos de HPV en mujeres con citología normal a nivel mundial.**

HPV related statistics: Women with normal cervical cytology, HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of women tested	HPV prevalence	95% confidence interval
World	1st	16	218339	2.7	(2.7-2.8)
	2nd	31	208818	1.1	(1.1-1.2)
	3rd	18	215093	1.1	(1.0-1.1)
	4th	52	193577	1.0	(0.9-1.0)
	5th	51	191886	0.8	(0.8-0.9)
	6th	58	196908	0.7	(0.7-0.7)
	7th	56	192557	0.6	(0.6-0.7)
	8th	39	191492	0.6	(0.6-0.7)
	9th	45	194232	0.6	(0.5-0.6)
	10th	33	207376	0.5	(0.5-0.6)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.

Source: Data have been compiled by the HPV Information Centre in the Unit of Infections and Cancer at the Institut Català d'Oncologia and have been published as meta-analysis in: De Sanjosé S, Lancet Infect Dis 2007; 7: 453 and Bruni L, 25th IPV Society Meeting, Malmo, Sweden, 8-14 May 2009 (Manuscript in preparation).

**Figura 6. Distribución de los tipos de HPV en lesiones neoplásicas intraepiteliales de bajo grado a nivel mundial.**

HPV related statistics: Precancerous cervical lesions (Low grade), HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
World	1st	16	14762	18.5	(17.9-19.2)
	2nd	51	8667	7.5	(7.0-8.1)
	3rd	31	13233	7.3	(6.8-7.7)
	4th	52	8536	6.7	(6.1-7.2)
	5th	56	8379	6.4	(5.9-7.0)
	6th	58	8954	6.3	(5.8-6.9)
	7th	66	7447	6.1	(5.6-6.6)
	8th	18	14150	5.8	(5.5-6.2)
	9th	6	8439	5.2	(4.8-5.7)
	10th	39	8211	5.1	(4.7-5.6)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.

Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford GM, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1157

**Figura 7. Distribución de los tipos de HPV en lesiones neoplásicas intraepiteliales de alto grado a nivel mundial.**

HPV related statistics: Precancerous cervical lesions (High grade), HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
World	1st	16	14901	44.1	(43.3-44.9)
	2nd	31	13290	9.4	(8.9-9.9)
	3rd	58	10113	7.7	(7.2-8.3)
	4th	33	13278	7.6	(7.2-8.1)
	5th	52	9885	7.2	(6.7-7.7)
	6th	18	14014	7	(6.6-7.4)
	7th	51	9028	4.6	(4.2-5.1)
	8th	35	10356	3.6	(3.2-3.9)
	9th	45	9573	2.8	(2.5-3.2)
	10th	39	8576	2.7	(2.4-3.1)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.

Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford G, Br J Cancer 2003;89:101 | Smith JS Int J Cancer 2007;121:621

**Figura 8. Distribución de los tipos de HPV en mujeres con cáncer de cérvix a nivel mundial.**

HPV related statistics: Cervical cancer by histology, HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	Any histology				Squamous cell carcinoma				Adeno/Adenosquamous carcinoma				Unspecified histology			
		HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
World	1st	16	22826	54.4	(53.8-55.1)	16	14441	57.6	(56.7-58.4)	18	3100	38.7	(37.0-40.4)	16	5276	57	(55.7-58.4)
	2nd	18	22514	16.5	(16.0-17.0)	18	14242	12.2	(11.7-12.8)	16	3109	35.3	(33.7-37.1)	18	5172	14.9	(13.9-15.9)
	3rd	58	16764	5.1	(4.8-5.5)	58	10895	5.4	(5.0-5.9)	45	1992	5.2	(4.3-6.3)	58	4002	5.9	(5.2-6.7)
	4th	33	20138	4.7	(4.4-5.0)	33	12829	5	(4.7-5.4)	33	2421	2.5	(1.9-3.2)	33	4888	5	(4.4-5.7)
	5th	45	15440	4.4	(4.1-4.7)	45	10090	4.3	(3.9-4.7)	31	2027	2.4	(1.8-3.1)	52	3478	4.3	(3.6-5.0)
	6th	31	18248	3.6	(3.3-3.8)	31	11519	3.6	(3.3-4.0)	58	1867	1.8	(1.2-2.5)	45	3358	4.1	(3.5-4.9)
	7th	52	16560	3.4	(3.1-3.7)	52	11097	3.5	(3.2-3.9)	52	1985	1.3	(0.9-1.9)	31	4702	3.9	(3.4-4.5)
	8th	35	15718	1.9	(1.7-2.1)	35	10138	1.7	(1.5-2.0)	59	1704	0.9	(0.5-1.4)	35	3794	2.7	(2.2-3.3)
	9th	39	12657	1.3	(1.1-1.5)	39	8637	1.6	(1.3-1.8)	51	1538	0.8	(0.5-1.4)	59	2753	2.4	(1.8-3.0)
	10th	59	12758	1.3	(1.1-1.5)	51	8797	1	(0.8-1.3)	35	1786	0.7	(0.3-1.2)	51	2460	1.9	(1.4-2.5)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.

Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford G, Br J Cancer 2003;88:163 | Clifford G, Int J Cancer 2008; 122: 1684



**Figura 9. Distribución de los tipos de HPV en mujeres con citología normal en Europa.**

HPV related statistics: Women with normal cervical cytology, HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of women tested	HPV prevalence	95% confidence interval
European Region (EUR)	1st	16	132100	2.4	(2.4-2.5)
	2nd	31	130032	1.4	(1.4-1.5)
	3rd	51	120003	0.9	(0.8-0.9)
	4th	18	129029	0.9	(0.8-0.9)
	5th	52	119884	0.9	(0.8-0.9)
	6th	39	119544	0.7	(0.7-0.8)
	7th	56	119671	0.6	(0.6-0.6)
	8th	45	121118	0.6	(0.5-0.6)
	9th	33	128373	0.5	(0.5-0.6)
	10th	58	120003	0.5	(0.4-0.5)

*Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.*  
*Source: Data have been compiled by the HPV Information Centre in the Unit of Infections and Cancer at the Institut Català d'Oncologia and have been published as meta-analysis in: De Sanjosé S, Lancet Infect Dis 2007; 7: 453 and Bruni L, 25th IPV Society Meeting, Malmo, Sweden, 8-14 May 2009 (Manuscript in preparation).*

**Figura 10. Distribución de los tipos de HPV en lesiones neoplásicas intraepiteliales de bajo grado en Europa.**

HPV related statistics: Precancerous cervical lesions (Low grade), HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
European Region (EUR)	1st	16	7148	19.4	(18.5-20.3)
	2nd	31	6624	8.6	(8.0-9.3)
	3rd	51	2859	7.7	(6.7-8.7)
	4th	66	2484	6.2	(5.3-7.2)
	5th	6	3069	5.1	(4.4-6.0)
	6th	33	6588	4.8	(4.3-5.4)
	7th	18	6967	4.5	(4.0-5.0)
	8th	52	2885	4.3	(3.6-5.1)
	9th	58	2848	4.2	(3.5-5.0)
	10th	56	2839	4.1	(3.4-4.8)

*Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.*  
*Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford GM, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1157*

**Figura 11. Distribución de los tipos de HPV en lesiones neoplásicas intraepiteliales de alto grado en Europa.**

HPV related statistics: Precancerous cervical lesions (High grade), HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
European Region (EUR)	1st	16	7730	46.9	(45.8-48.0)
	2nd	31	7529	10.5	(9.8-11.2)
	3rd	33	7265	8.6	(8.0-9.3)
	4th	52	5089	6.5	(5.8-7.2)
	5th	18	7469	6.1	(5.5-6.6)
	6th	51	4954	5	(4.4-5.7)
	7th	58	4999	4.3	(3.7-4.9)
	8th	35	5357	3.3	(2.9-3.9)
	9th	45	5223	3.2	(2.7-3.7)
	10th	39	4737	2.8	(2.4-3.3)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.  
Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford G, Br J Cancer 2003;89:101 | Smith JS Int J Cancer 2007;121:621

**Figura 12. Distribución de los tipos de HPV en mujeres con cáncer de cérvix en Europa.**

HPV related statistics: Cervical cancer by histology, HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	Any histology				Squamous cell carcinoma				Adeno/Adenosquamous carcinoma				Unspecified histology			
		HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
European Region (EUR)	1st	16	6674	57.7	(56.5-58.9)	16	3863	62.1	(60.5-63.6)	18	1298	38.4	(35.7-41.1)	16	1513	64.7	(62.2-67.1)
	2nd	18	6541	16.8	(15.9-17.7)	18	3863	10.9	(9.9-11.9)	16	1298	36.4	(33.8-39.1)	18	1380	13.2	(11.4-15.1)
	3rd	33	6387	4.3	(3.8-4.8)	31	3321	4.1	(3.5-4.9)	45	881	5.9	(4.4-7.7)	33	1427	7.2	(5.9-8.7)
	4th	31	5625	4.1	(3.6-4.7)	33	3863	3.8	(3.2-4.5)	31	899	4.1	(2.9-5.6)	31	1405	4.2	(3.2-5.4)
	5th	45	4342	3.5	(3.0-4.1)	45	2582	3.1	(2.5-3.9)	33	1097	2	(1.3-3.0)	35	954	3.8	(2.7-5.2)
	6th	35	4158	1.5	(1.2-2.0)	52	2557	1.8	(1.4-2.4)	51	643	1.7	(0.9-3.0)	45	879	2.4	(1.5-3.6)
	7th	52	3939	1.4	(1.0-1.8)	68	1344	1.6	(1.0-2.5)	52	801	0.5	(0.1-1.3)	73	399	1.3	(0.4-2.9)
	8th	58	3416	1.1	(0.8-1.6)	56	1625	1.4	(0.9-2.0)	35	739	0.4	(0.1-1.2)	39	377	1.1	(0.3-2.7)
	9th	68	2165	1.1	(0.7-1.6)	58	2159	1.4	(1.0-2.0)	39	654	0.3	(0.0-1.1)	58	580	1	(0.4-2.2)
	10th	39	2778	1	(0.6-1.4)	39	1747	1.2	(0.7-1.8)	58	677	0.3	(0.0-1.1)	11	724	0.8	(0.3-1.8)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.  
Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford G, Br J Cancer 2003;88:63 | Clifford G, Int J Cancer 2008; 122: 1684

**Figura 13. Distribución de los tipos de HPV en mujeres con citología normal en España.**

HPV related statistics: Women with normal cervical cytology, HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of women tested	HPV prevalence	95% confidence interval
Spain	1st	16	2344	1.6	(1.1-2.2)
	2nd	18	2344	0.7	(0.4-1.2)
	3rd	31	2344	0.5	(0.2-0.8)
	4th	33	2344	0.3	(0.1-0.7)
	5th	11	1897	0.1	(0.0-0.4)
	6th	51	1623	0.1	(0.0-0.3)
	7th	52	1623	0.1	(0.0-0.3)
	8th	39	1897	0.1	(0.0-0.3)
	9th	68	1623	0.1	(0.0-0.3)
	10th	35	1623	0.1	(0.0-0.2)
<p><i>Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.</i></p> <p><i>Source: Data have been compiled by the HPV Information Centre in the Unit of Infections and Cancer at the Institut Català d'Oncologia and have been published as meta-analysis in: De Sanjosé S, Lancet Infect Dis 2007; 7: 453 and Bruni L, 25th IPV Society Meeting, Malmo, Sweden, 8-14 May 2009 (Manuscript in preparation).</i></p> <p><i>References:</i></p> <p><i>Spain De Sanjose S, Sex Transm Dis 2003; 30: 788   Dillner J, BMJ 2008; 337: a1754   Gonzalez C, Sex Transm Infect 2006; 82: 260   Munoz N, Sex Transm Dis 1996; 23: 504</i></p>					

**Figura 14. Distribución de los tipos de HPV en lesiones neoplásicas intraepiteliales de bajo grado en España.**

HPV related statistics: Precancerous cervical lesions (Low grade), HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Spain	1st	16	151	17.9	(12.1-24.9)
	2nd	51	151	12.6	(7.7-19.0)
	3rd	66	151	8.6	(4.7-14.3)
	4th	31	151	5.3	(2.3-10.2)
	5th	58	151	5.3	(2.3-10.2)
	6th	33	151	4	(1.5-8.4)
	7th	56	151	3.3	(1.1-7.6)
	8th	52	151	2.6	(0.7-6.6)
	9th	18	151	2	(0.4-5.7)
	10th	39	151	2	(0.4-5.7)
<p><i>Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.</i></p> <p><i>Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford GM, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1157</i></p> <p><i>References:</i></p> <p><i>Spain Gonzalez-Bosquet E, Gynecol Oncol 2008; 111: 9</i></p>					

**Figura 15. Distribución de los tipos de HPV en lesiones neoplásicas intraepiteliales de alto grado en España.**

HPV related statistics: Precancerous cervical lesions (High grade), HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Spain	1st	16	363	44.4	(39.2-49.6)
	2nd	51	206	10.7	(6.8-15.7)
	3rd	31	363	8.5	(5.9-11.9)
	4th	66	206	7.8	(4.5-12.3)
	5th	33	363	6.9	(4.5-10.0)
	6th	58	206	6.3	(3.4-10.5)
	7th	52	206	4.4	(2.0-8.1)
	8th	56	206	2.9	(1.1-6.2)
	9th	18	363	2.5	(1.1-4.7)
	10th	39	206	2.4	(0.8-5.6)

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.  
Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford G, Br J Cancer 2003;89:101 | Smith JS Int J Cancer 2007;121:621

References:

Spain Bosch FX, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993; 2: 415 | Gonzalez-Bosquet E, Gynecol Oncol 2008; 111: 9

**Figura 16. Distribución de los tipos de HPV en mujeres con cáncer de cérvix en España.**

HPV related statistics: Cervical cancer by histology, HPV type distribution top10

country/region name	Ranking	Any histology				Squamous cell carcinoma				Adeno/Adenosquamous carcinoma				Unspecified histology			
		HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval	HPV type	Number of cases	HPV prevalence	95% confidence interval
Spain	1st	16	263	51	(44.7-57.1)	16	188	47.9	(40.5-55.3)	-	-	-	-	16	75	58.7	(46.7-69.9)
	2nd	31	263	5.3	(2.9-8.8)	18	188	4.3	(1.9-8.2)	-	-	-	-	31	75	8	(3.0-16.6)
	3rd	18	263	4.9	(2.7-8.3)	31	188	4.3	(1.9-8.2)	-	-	-	-	18	75	6.7	(2.2-14.9)
	4th	45	121	4.1	(1.4-9.4)	45	46	4.3	(0.5-14.8)	-	-	-	-	45	75	4	(0.8-11.2)
	5th	33	263	3	(1.3-5.9)	52	46	4.3	(0.5-14.8)	-	-	-	-	33	75	2.7	(0.3-9.3)
	6th	52	121	2.5	(0.5-7.1)	56	46	4.3	(0.5-14.8)	-	-	-	-	35	75	2.7	(0.3-9.3)
	7th	68	121	2.5	(0.5-7.1)	68	46	4.3	(0.5-14.8)	-	-	-	-	52	75	1.3	(0.0-7.2)
	8th	56	121	1.7	(0.2-5.8)	33	188	3.2	(1.2-6.8)	-	-	-	-	58	75	1.3	(0.0-7.2)
	9th	58	121	1.7	(0.2-5.8)	58	46	2.2	(0.1-11.5)	-	-	-	-	68	75	1.3	(0.0-7.2)
	10th	35	263	1.5	(0.4-3.8)	35	188	1.1	(0.1-3.8)	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: The ranking of the ten most frequent HPV types may present less than ten types because only a limited number of types were tested or were HPV-positive.  
Source: Data have been compiled by the IARC Infection and Cancer Epidemiology Group and have been published as a systematic review and meta-analysis in: Clifford G, Br J Cancer 2003;88:63 | Clifford G, Int J Cancer 2008; 122: 1684

References:

Spain Bosch FX, J Natl Cancer Inst 1995; 87: 796 | Gonzalez-Bosquet E, Gynecol Oncol 2008; 111: 9 | Munoz N, Int J Cancer 1992; 52: 743 | Rodriguez JA, Diagn Mol Pathol 1998; 7: 276

En España la distribución es bastante similar en las distintas provincias [23].

La infección por el virus del papiloma humano es causa necesaria para la aparición del cáncer de cérvix, pero no causa suficiente.

Aproximadamente el 80% de la población mundial sufrirá un episodio de infección por HPV a lo largo de su vida [24].

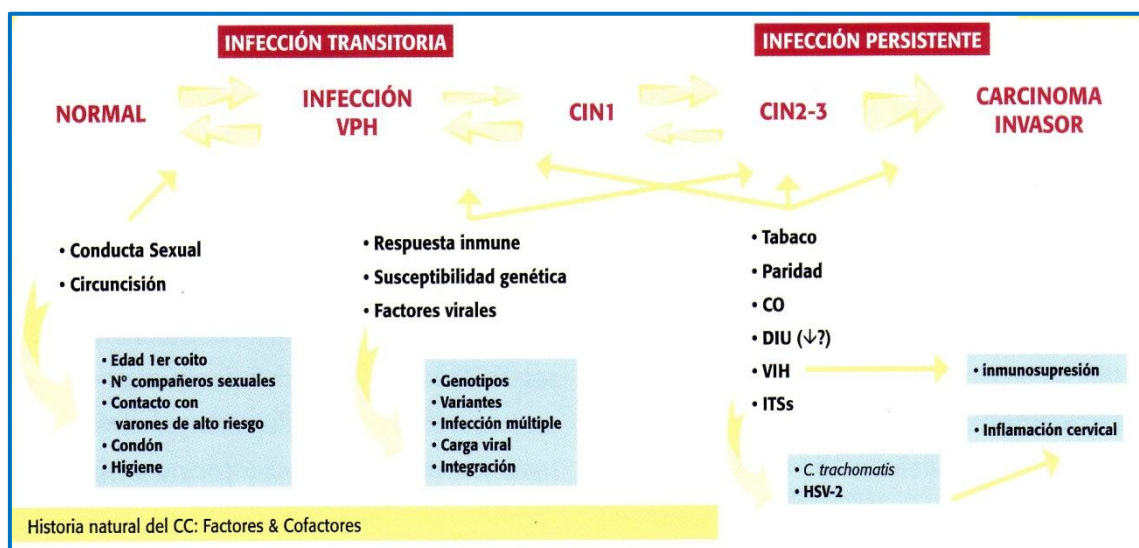
El proceso de carcinogénesis cervical supone la implicación de una serie de eventos, de los cuales la actividad sexual ocupa el primero, puesto que permite la entrada del virus en las células basales del epitelio cervical.

Si la infección inicial no se resuelve y se hace persistente puede iniciarse un proceso de oncogénesis que puede inducir la aparición de lesiones escamosas intraepiteliales (CIN).

Las tasas de regresión espontánea son muy elevadas, hasta un 80% de las lesiones en estadios iniciales (CIN 1, LSIL) regresarán durante el primer año, y hasta un 90% al final del segundo año, eliminándose la infección y normalizándose el epitelio cervical. Sin embargo sólo un 20% de las lesiones CIN2/3 y CIS (carcinoma in situ) regresarán a la normalidad.

Aunque la infección por HPV es muy frecuente en la población, la mayoría de las mujeres la aclaran y no progresan. Por tanto es necesaria la existencia de otros factores y cofactores que influyen en el proceso de carcinogénesis. Algunos favorecen la regresión de la enfermedad mientras que otros modulan la progresión de la misma (Figura 17).

**Figura 17. Factores y cofactores en la carcinogénesis cervical**





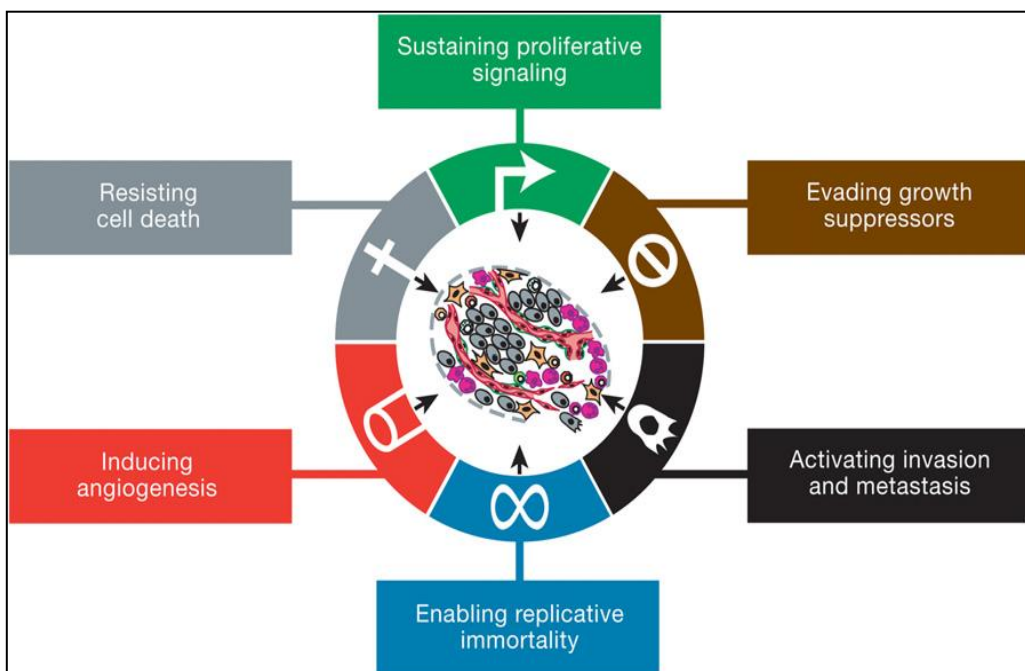


Está bien establecido que el cáncer es una enfermedad que implica cambios en el genoma de las células cancerosas, el cual se modifica en múltiples sitios, sufriendo alteraciones muy variables, algunas muy sutiles como mutaciones puntuales y otras más evidentes como cambios en la dotación cromosómica.

Las mutaciones van a condicionar un predominio de los oncogenes sobre los genes supresores tumorales. Ambas clases de genes se van a encontrar alterados en el cáncer humano y van a llevar a la transformación de células normales en células con fenotipo canceroso maligno que muestran los cambios morfológicos propios de la célula neoplásica.

Hanahan y Weinberg sugirieron que las múltiples alteraciones del genoma de la célula cancerosa se manifiestan en seis características esenciales de la fisiología celular que determinan conjuntamente la transformación a un fenotipo maligno (figura 19) [27].

**Figura 19. Capacidades adquiridas en el proceso de la oncogénesis responsables de la transformación a un fenotipo maligno.**

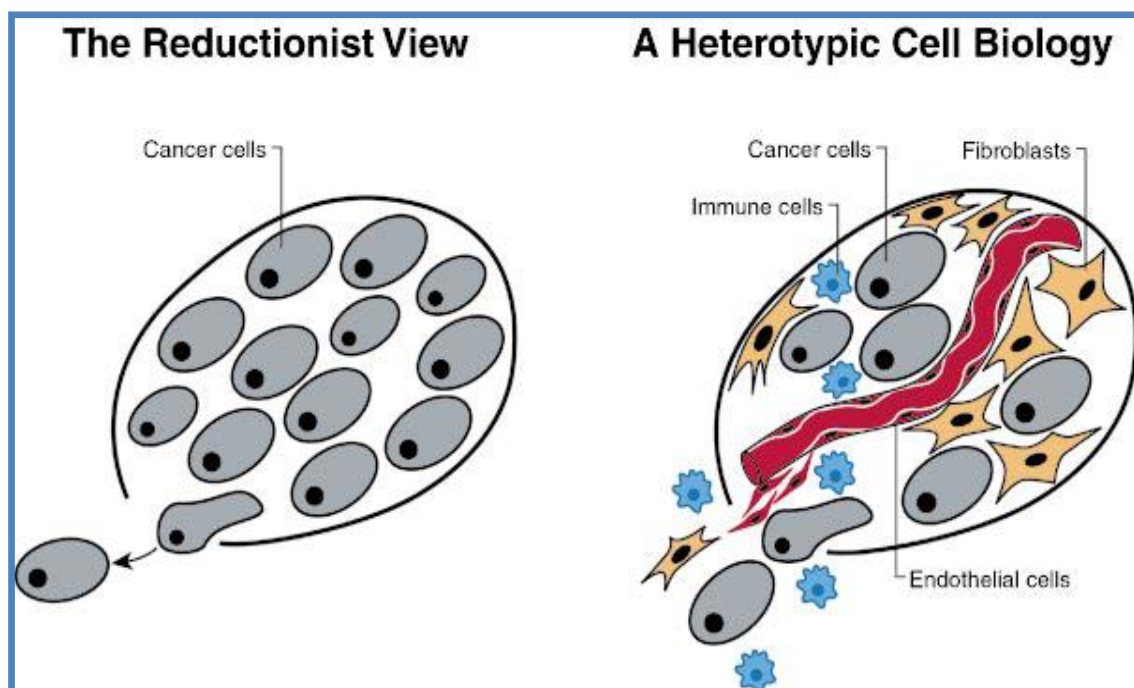


Esas características esenciales, tal y como se reflejan en la figura 19, son las siguientes:

- autosuficiencia en la producción de factores de crecimiento
- insensibilidad a los factores de inhibición de crecimiento
- evasión de la muerte celular programada (apoptosis)
- capacidad de replicación ilimitada (inmortalización)
- angiogénesis continuada
- invasión del tejido y producción de metástasis

Una vez reconocidas estas características se ha evidenciado la existencia de una realidad biológica más compleja y amplia, el denominado microambiente tumoral, que es la clave de la oncogénesis molecular in vivo (figura 20). Las células cancerosas experimentan mutaciones en su genoma adquiriendo un fenotipo maligno e influyendo además en su microambiente circundante, un complejo sistema de diversos tipos celulares, vasos y moléculas que participan en la iniciación y progresión del tumor.

**Figura 20. Evolución de los conceptos sobre la oncogénesis.**





El concepto de microambiente tumoral se encuentra en la actualidad ampliamente estudiado [28,29].

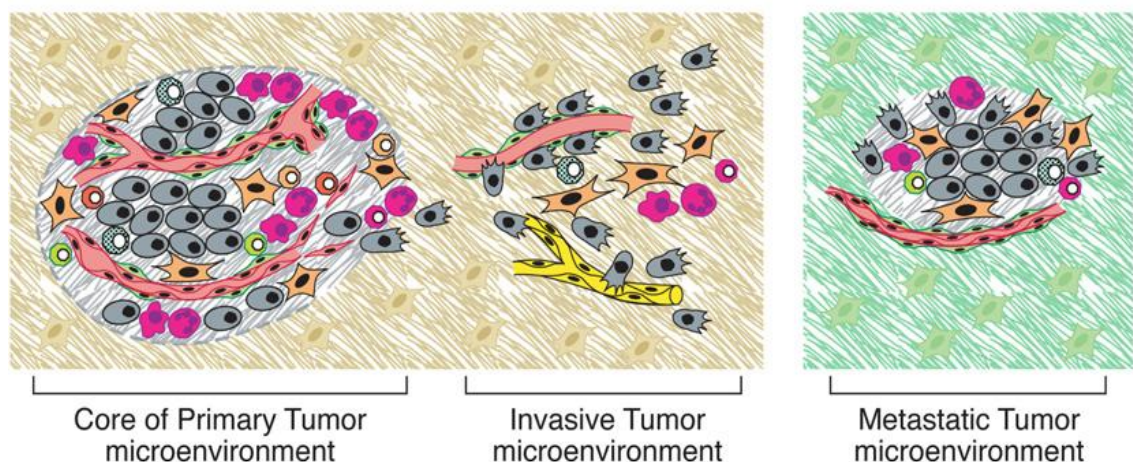
Se trata de un complejo sistema que rodea a las células neoplásicas. Para poder proseguir el desarrollo tumoral el cáncer necesita establecer anómalas interacciones entre las células neoplásicas incipientes y las microestructuras vecinas normales, a las que recluta y modifica para que colaboren activamente en la progresión del proceso neoplásico.

Este proceso es activado por una comunicación paracrina constante, y crea un conjunto de circuitos de señales dinámicas que promueven el crecimiento del tumor, llevando en última instancia a una enfermedad fatal [26,28,29].

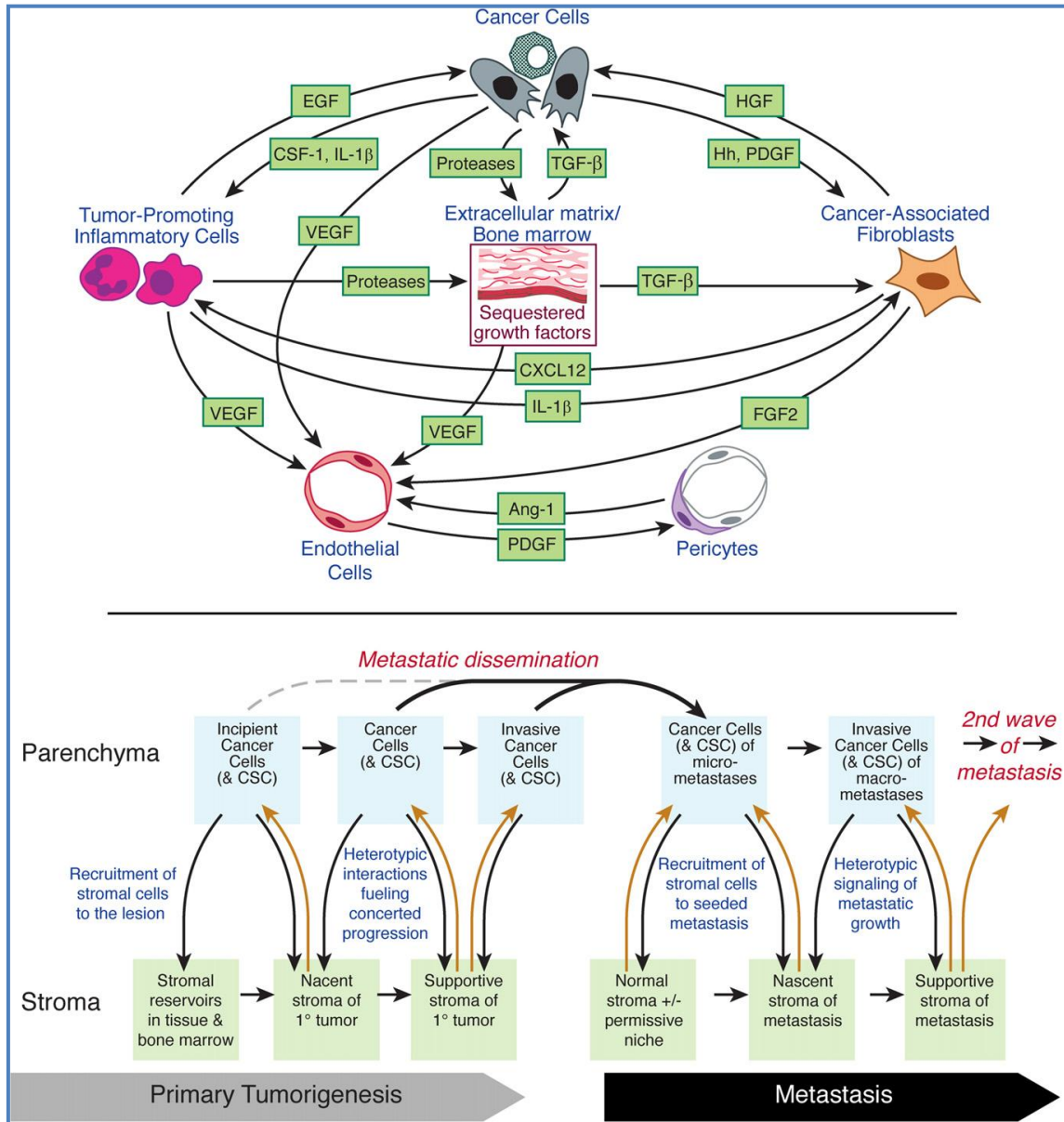
Por otra parte, todos los tumores malignos y sus metástasis precisan para continuar desarrollándose la colaboración del microambiente tumoral, lo que ha posibilitado la aparición de nuevas vías de investigación en terapéutica oncológica, con resultados esperanzadores.

Entre los diversos componentes del microambiente tumoral se incluyen fibroblastos de distintos tipos, pericitos, matriz extracelular, diferentes clases de linfocitos T, B y NK, células mieloides y endoteliales, así como células presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas de Langherans (figuras 21 y 22).

**Figura 21. El microambiente tumoral.**



**Figura 22. Señalización interactiva en el microambiente tumoral durante el proceso de progresión y metastatización tumoral.**



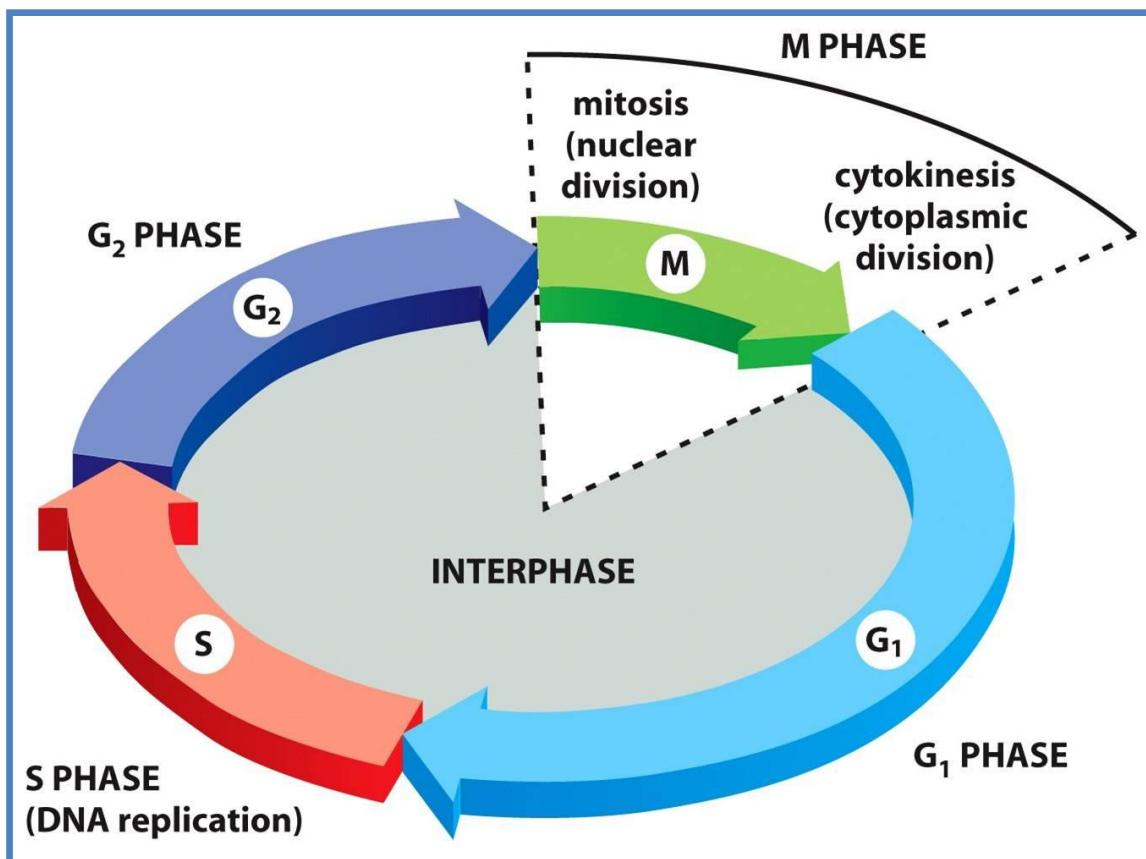
### 3.1. Transformación celular por Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (HPV-AR)

En el cérvix uterino se han identificado lesiones intraepiteliales que representan pasos intermedios de un proceso de malignización, que lleva a las células normales a convertirse en neoplasias premalignas y finalmente en un cáncer invasor.

La oncogénesis es un proceso de múltiples fases en las que se producen sucesivas alteraciones genéticas, provocadas por la infección de los virus del papiloma humano de alto riesgo debido a que esta infección desencadena una disregulación del ciclo celular.

La célula normal tiene un mecanismo estricto de control que tiene como objetivo iniciar el ciclo celular y reparar el DNA previamente a cada división celular, evitando que se acumulen en el genoma celular los errores genéticos producidos durante los procesos de replicación. Dichos errores son favorecidos por determinados cofactores, como puede ser el tabaco (figura 23).

**Figura 23. Fases del ciclo celular normal**



Cada vez que tiene lugar un cambio en el material genético éste es detectado por un complejo sistema de control del ciclo celular y posteriormente reparado con la mediación de proteínas, como p53 y Retinoblastoma (Rb).

Si el error, o la acumulación de los mismos, es irreparable, la nueva célula recién formada es eliminada mediante un proceso activo de muerte celular programada, al que denominamos apoptosis.

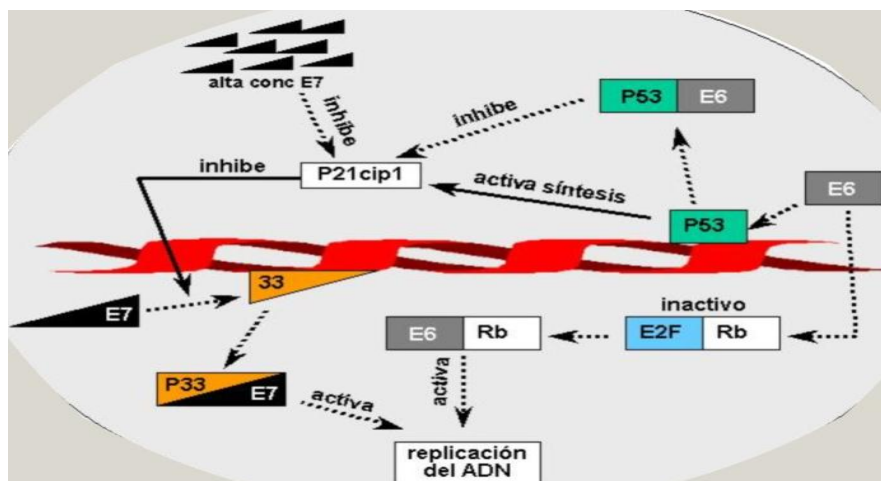
Un evento que se considera irreparable es la detección de secuencias genómicas de HPV-AR, por lo que la célula infectada es conducida por el sistema de control al proceso de muerte celular.

Para evitar la apoptosis de las células infectadas, los HPV-AR han desarrollado una estrategia de defensa que permita escapar de la muerte celular, lo que predispondrá a la transformación neoplásica.

### 3.2. Oncogenes virales

Los virus del papiloma humano de alto riesgo poseen dos regiones denominadas E6 y E7. Estas regiones tienen la finalidad de traducir dos proteínas del mismo nombre, que tienen la capacidad de bloquear y degradar respectivamente a las proteínas del ciclo celular p53 y Rb, y como consecuencia evadir así la vigilancia y la función reparadora de dichas proteínas sobre el ciclo celular (figura 24).

**Figura 24. Expresión de los oncogenes virales.**



Cuando las proteínas p53 y Rb son degradadas la célula será incapaz de reparar los errores genéticos o de conducir a la célula hacia la apoptosis, provocando una susceptibilidad a la transformación neoplásica.

La expresión de las proteínas degradantes E6 y E7 de los HPV se verá modificada por diversos factores, como la carga viral, la integración del genoma viral en el genoma de la célula infectada, o cofactores como el tabaco o el uso de anticonceptivos orales a largo plazo.

Algunos estudios han demostrado que la expresión basal de E6 y E7 en los HPV es muy baja comparada con la proteína E2, debido a la acción reguladora negativa de la región LCR, la cual mantiene prácticamente silenciada la expresión de estos genes. Por ello, en principio el HPV no sería capaz de producir suficiente cantidad de E6 y E7 como para provocar el proceso de defensa o reparación celular.

Analizando la biología de la infección por HPV se ha podido demostrar que en ciertos casos y tras un proceso de integración viral en el genoma celular, generalmente por disrupción de la región E2, la región reguladora LCR se ve afectada e impide la represión de la transcripción de E6 y E7, con la consiguiente sobreexpresión de sus proteínas oncogénicas. Así una pequeña cantidad de virus podría producir grandes cantidades de proteínas E6 y E7, que bloquearían a p53 y Rb y se establecería el proceso de transformación neoplásica [30, 31].

Recientemente se ha demostrado que aunque el proceso de integración viral favorece el proceso de transformación neoplásica, es indicador de infección persistente, y favorece la estabilización del fenotipo tumoral, no debe ser considerado necesario para la inducción de la transformación celular, ya que en ausencia de esta integración de secuencias genómicas de HPV en el DNA huésped, también se puede producir la transformación celular por mecanismos distintos a la disregulación de la expresión de E6 y E7. Incluso la expresión basal de estas proteínas puede ser suficiente para desencadenar el proceso de transformación neoplásica cuando las cargas virales son elevadas [32].

La demostración de que la transformación neoplásica puede iniciarse con o sin integración viral valida diferentes vías biológicas para el proceso de oncogénesis, ya que si bien se ha demostrado que ciertas líneas celulares derivadas de tumores presentan integración completa del genoma vírico en el huésped, este hecho no demuestra la necesidad de tal suceso para la aparición del fenotipo tumoral, sino que más bien podría ser accesorio a otras características que le confieren a esas líneas celulares la consideración de clonales [33].

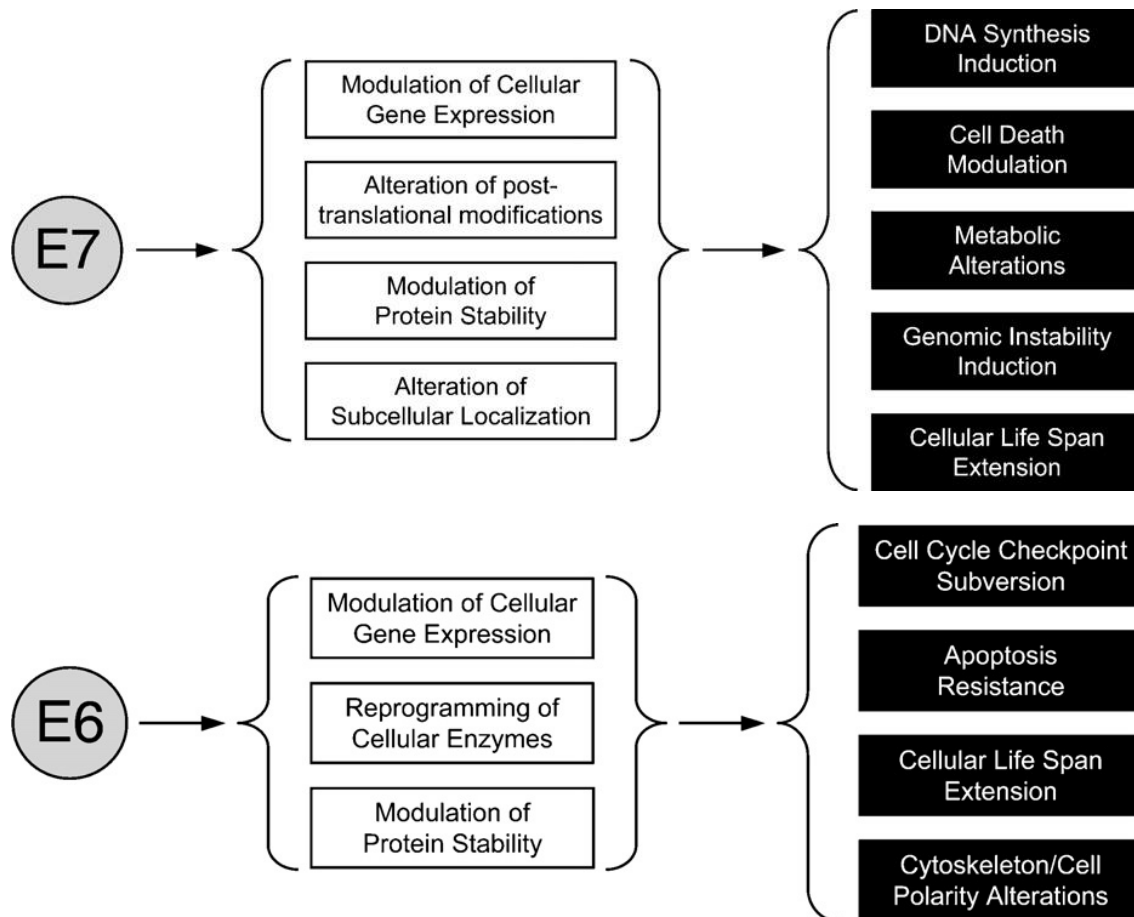
Ha quedado demostrado que existe un porcentaje de lesiones tumorales donde no se ha demostrado integración o bien coexisten las formas episomal (no integrada) e integrada.

Podemos afirmar que la integración viral provoca un estado persistente de expresión de oncoproteína, y que este mismo estado puede darse con la conjunción de otros factores distintos de la integración, haciendo de ésta una causa suficiente pero no necesaria para conferir a la célula características de transformación neoplásica.

De este modo, sea por procesos de integración o por la intervención de rutas biológicas diferentes, la pérdida de E2, represor de la transcripción viral, disregula la expresión de los genes HPV E6/E7, siendo las proteínas E6 y E7 las únicas proteínas virales que se expresan constantemente en los carcinomas cervicales.

En los cánceres asociados a HPV-AR (HPV de alto riesgo), los oncogenes E6 y E7 actúan sobre reguladores críticos de procesos celulares, y por tanto la expresión de estas oncoproteínas ocasiona múltiples cambios celulares oncogénicos. Los principales mecanismos de actuación de las oncoproteínas E6 y E7 son los que se reflejan en el esquema que se muestra a continuación (figura 25) [34].

**Figura 25. Mecanismos de actuación y cambios celulares inducidos por las oncoproteínas E6 y E7, responsables del fenotipo oncogénico.**



Las oncoproteínas E6 y E7 contribuyen al desarrollo inicial y a la progresión del tumor (figura 26).

La E7 bloquea el frenado del ciclo celular G1/S al degradar la proteína supresora retinoblastoma Rb y liberar el factor de transcripción E2F.

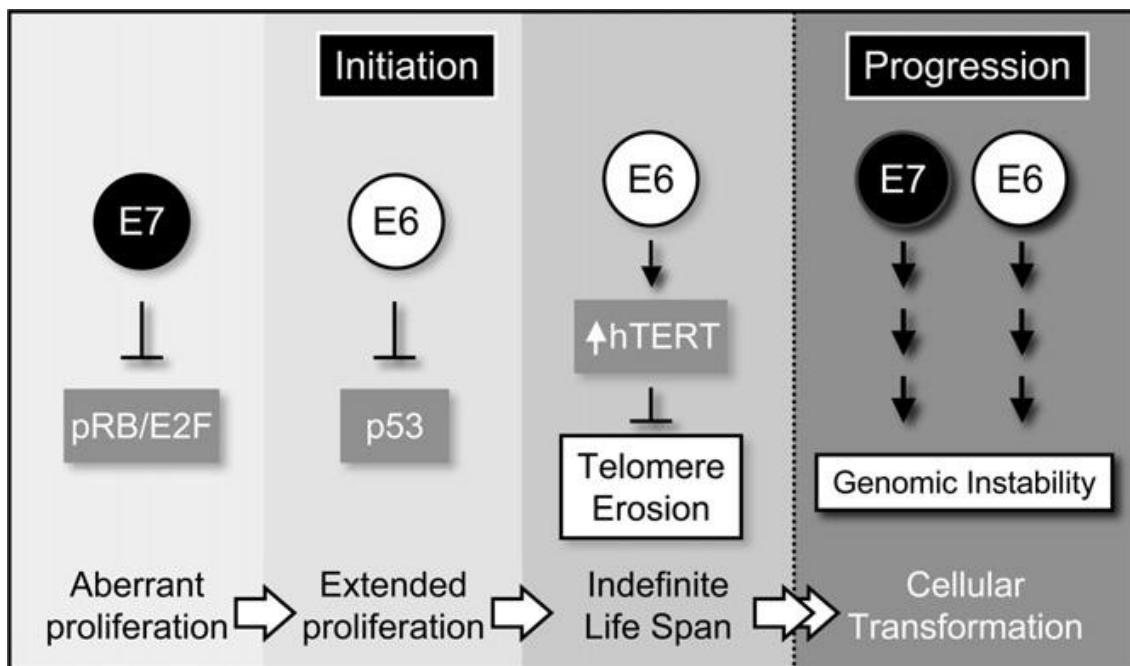
Esto motiva un inicio aberrante del ciclo, que en condiciones de normalidad motivaría la activación de la proteína supresora p53 y causaría la muerte celular.

Contrariamente, a su vez la E6 degrada la p53 permitiendo que las células experimenten una persistencia de la proliferación aberrante.



Para evitar la erosión de la telomerasa, que resultaría de la división celular continuada, la E6 activa asimismo la transcripción de hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) que causa la inmortalización de las células.

**Figura 26. Esquema de las bases moleculares de la transformación oncogénica celular por HPV de alto riesgo. Efecto de las oncoproteínas E6 y E7 en la iniciación y progresión oncogénica.**



Las oncoproteínas E6 y E7 actúan, además, como potentes modificadores de la mitosis, aumentando la probabilidad de adquirir mutaciones celulares adicionales que contribuyen a la progresión carcinogénica durante cada ciclo de la división celular.

Se ha observado in vitro que las células epiteliales humanas inmortalizadas por el HPV, inicialmente no tumorales, adquieren un fenotipo completamente transformado conforme tienen lugar los sucesivos ciclos de división celular [30].



La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 también se ha implicado en la disregulación de otros eventos celulares asociados con la progresión maligna, como la transición del epitelio al estroma y la angiogénesis [34].

La primera es un proceso por el que las células epiteliales adquieren ciertas características de los fibroblastos que serían el último paso de la desdiferenciación celular. Se cree que juega un papel clave en la carcinogénesis, asociada con un aumento del potencial invasivo y la producción de metástasis.

La angiogénesis es un proceso necesario para la progresión tumoral, al asegurar el aporte adecuado y mantenido de nutrientes y oxígeno, que son imprescindibles para el crecimiento rápido del tumor.

El oncogén E6 del HPV 16 se ha demostrado que induce la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor) y además aumenta la expresión de la proteína ligada al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, Fibroblast Growth Factor), que está implicada también en la modulación del inicio de la angiogénesis.

### **3.3. Mecanismos de evasión tumoral, persistencia de la infección viral.**

Muchos virus son capaces de mantener infecciones a largo plazo sin efectos citopáticos, aunque con producción de viriones, bien de forma crónica o bien con reactivaciones productivas intermitentes.

El patrón de infección, crónica o latente, y la aparición de brotes con efectos citopáticos van a ser totalmente dependientes de las condiciones celulares del huésped.

La persistencia de la infección viral requiere de la evasión de la detección y la eliminación de las células virales por parte del sistema inmune.

Estos procesos de evasión pueden producirse por diferentes vías. En determinados casos los virus presentarán antígenos de superficie muy variables que conducen a la síntesis de un exceso de anticuerpos no

neutralizantes, que pueden llegar a interferir con los que sí tienen esa capacidad de neutralización.

Otro mecanismo de evasión ha sido observado en ciertos tumores en los que la respuesta inmunitaria es evitada mediante la depleción de la expresión de moléculas del MHC (complejo de histocompatibilidad mayor). Este mecanismo de evasión se evidencia fundamentalmente en aquellos tumores en los que no es posible mimetizar la presencia de antígenos de superficie, por ser necesarios para el mantenimiento del fenotipo tumoral [35, 36].

Muchas infecciones víricas toman como diana células inmunocompetentes como CD4+T y células de Langerhans, comprometiendo la eliminación de la infección por alteración de los mediadores en el montaje de la respuesta inmune.

En verrugas genitales se ha observado una disminución notable del número de células de Langerhans, con la consiguiente disminución de la capacidad de presentación antigénica. Se han constatado también importantes disminuciones en la actividad de las células NK (Natural Killer), con funciones de inmunidad inespecífica, en lesiones premalignas y malignas.

La incapacidad del sistema inmune para resolver la infección en un plazo de tiempo corto o medio, generalmente menor de dos años, aumenta las posibilidades de que exista un daño celular continuado y como consecuencia un proceso de susceptibilidad a la neoplasia.

La persistencia de la infección por encima de este plazo constituye un factor de riesgo demostrado y necesario para la transformación celular [37, 38].

### **3.4. Historia biológica de la infección por HPV y carcinogénesis**

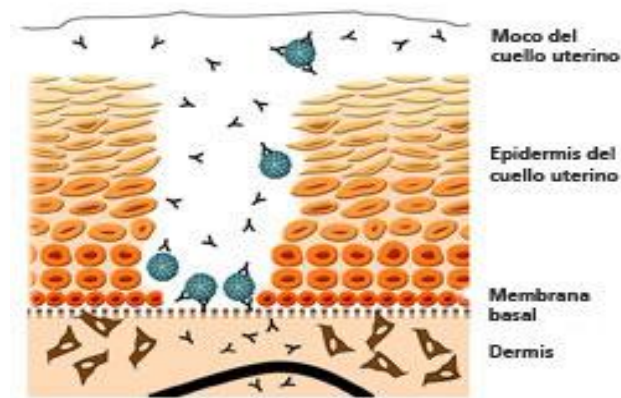
La demostrada relación causal entre la infección por ciertos tipos de HPV y la génesis de patologías neoplásicas requiere la existencia de un mecanismo biológico establecido que explique esa asociación tan íntima entre causa y efecto.

Pongamos un ejemplo a modo ilustrativo para poder entender las diferentes condiciones que se pueden reproducir cuando entra en contacto el HPV y el huésped y comprender así por qué el desenlace de la infección puede desembocar en situaciones tan dispares como la eliminación total del virus o el desarrollo de un carcinoma invasivo de consecuencias fatales. Cuando tiene lugar una relación sexual se puede transmitir un pool de HPV como por ejemplo un tipo 16, de alto riesgo, acompañado por un tipo 56, también de alto riesgo, y un tipo 81 de bajo riesgo.

En primer lugar puede ocurrir, de hecho con elevada frecuencia, que los agentes de la inmunidad inespecífica como macrófagos, linfocitos, etc, que resumiremos como agentes inflamatorios, sean capaces de impedir a los HPV afincarse en el epitelio, generalmente un epitelio íntegro sin microlesiones, y las partículas virales sean arrastradas al exterior junto con el flujo de moco cervical. En este caso debemos tener en cuenta que ante una determinación de HPV el resultado de laboratorio nos arrojaría un resultado positivo para HPV 16, 56, y 81 sin que siquiera haya llegado a infectarse el epitelio, el virus estaría presente de una forma exclusivamente transitoria.

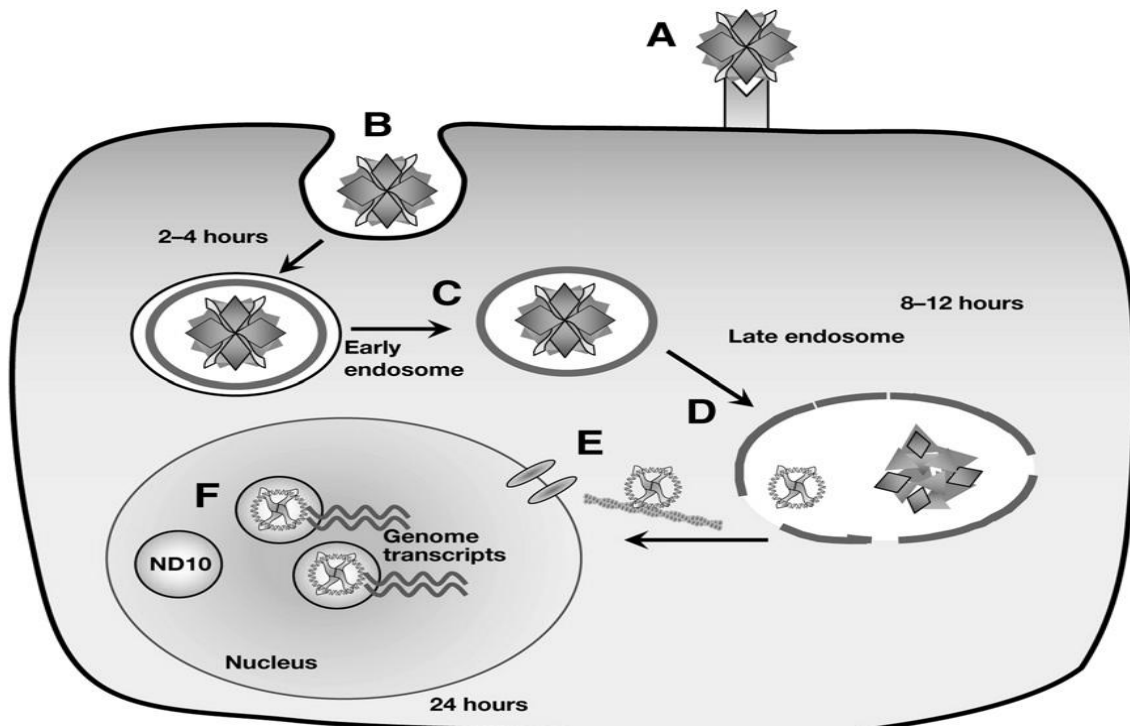
La siguiente opción biológica que se presenta es que los HPV logren esquivar esta primera barrera de defensa que supone la inmunidad inespecífica y se logren establecer en estratos inferiores del epitelio favorecidos por la existencia de microfisuras que les permitan alcanzar la capa basal donde ven favorecido su tropismo (figura 27).

**Figura 27. Entrada del HPV a través de microfisuras del epitelio.**



Si el huésped no dispone de mecanismos más potentes de inmunidad específica humoral, es decir, de anticuerpos, existe una gran probabilidad de que el virus sea capaz de introducirse en algunas células basales utilizando como puerta de entrada un receptor específico de la superficie de éstas (figura 28).

**Figura 28. Entrada del HPV en la célula. Procesos que tienen lugar a nivel intracelular en las primeras 24 horas.**



Una vez el virus se haya introducido en las células podemos hablar de una infección por HPV, al contrario que en el primer ejemplo, donde sólo existía una mera presencia viral.

En ambos casos el resultado del laboratorio sería el mismo: “positivo para HPV 16, 56 y 81”, aunque la implicación biológica es totalmente diferente en cada caso.

Nos encontramos ahora ante un escenario en el que las células del epitelio se ven invadidas por la presencia de un cuerpo extraño ante el cual han de desplegar nuevas estrategias de defensa. En este momento el conflicto entre las células y su invasor va a desembocar en una serie de cambios morfológicos y biológicos que conducen a una lesión citológica tipo ASCUS (atipia de células escamosas de significado indeterminado) o SIL (lesión escamosa intraepitelial) de bajo grado, y a una lesión histológica tipo CIN1 (neoplasia intraepitelial grado 1).

A nivel intracelular va tener lugar una serie de eventos. El HPV penetra en las células basales, cuya tasa de recambio es muy elevada y donde el DNA celular va a ser replicado y duplicado para la formación de una nueva célula. Como ocurre en todas las células, la nueva copia de DNA se ha fabricado con una serie de errores intrínsecos a la división celular que han de ser reparados para cumplir el control de calidad que se requiere para crear esa nueva célula. Es de interés remarcar que determinados cofactores carcinogénicos, como el tabaco, promueven el acumulo de este tipo de errores.

De la reparación de los errores del DNA se encargan una serie de proteínas que colaboran en cascada en el denominado “ciclo celular” y de las que destacamos dos concretamente, que se denominan p53 y Rb. Estas proteínas lideran un proceso de reparación mediante el cual las bases nucleótidas erróneas del DNA serán sustituidas por las correctas.

Cuando p53 y Rb se encuentran con el genoma del HPV, al ser un DNA extraño para ellas, intentan reparar ese “error genético”, pero sin éxito, dado el gran tamaño (8.000 pares de bases), por lo que utilizan un mecanismo de defensa alternativo consistente en etiquetar a la célula como no apta y dirigirla a un proceso de muerte celular programada

(apoptosis). Esto ocurrirá en las células infectadas por virus de bajo riesgo (en el ejemplo que hemos utilizado sería el 81), aunque en el caso de las células infectadas por los tipos de alto riesgo (16 y 56 en el ejemplo) este mecanismo de defensa fracasará a causa de un proceso desencadenado por los HPV de alto riesgo.

Para evitar que las células infectadas sean detectadas y conducidas a la apoptosis, los tipos denominados de alto riesgo han desarrollado una capacidad especial que será la base de su potencial transformante. Sus proteínas E6 y E7, al contrario de lo que ocurre en los tipos de bajo riesgo, tienen la capacidad de bloquear respectivamente a p53 y Rb, anulando la capacidad de éstas de detectar la presencia viral, pero con una consecuencia mucho más grave, ya que tampoco se repararán los errores intrínsecos a la división celular, permitiendo que una estirpe celular con DNA replicado y no reparado se perpetúe en el epitelio (figura 26), incrementándose la inestabilidad genómica.

De la magnitud de esos cambios genéticos, su gravedad y su capacidad de ser transmitidos a las células hijas (los cambios muy graves son incompatibles con la vida celular) dependerá el fenotipo celular, llegando en ocasiones a convertirse en una estirpe clonal tumoral.

Este mecanismo explica la afirmación inicial de que en términos estrictamente biológicos los HPV no son oncogénicos “per se” sino que favorecen un estado celular susceptible a la transformación neoplásica. Es probable que a nivel citológico podamos observar cambios más consolidados del tipo SIL de alto grado, y en función de cuantas células afecte del epitelio una imagen histológica de CIN2.

Por el momento el HPV ha escapado de las defensas celulares, pero se va a desencadenar un mecanismo alternativo, la llamada inmunidad celular, que se ocupa de aquellas células que muestran alteraciones en su superficie.

Parte de las proteínas virales se presentarán en la superficie de la célula y serán reconocidas por los sistemas de inmunidad celular que señalarán a la misma como portadora de un agente intracelular extraño. Tras una serie de pasos complejos de reconocimiento, identificación y activación,

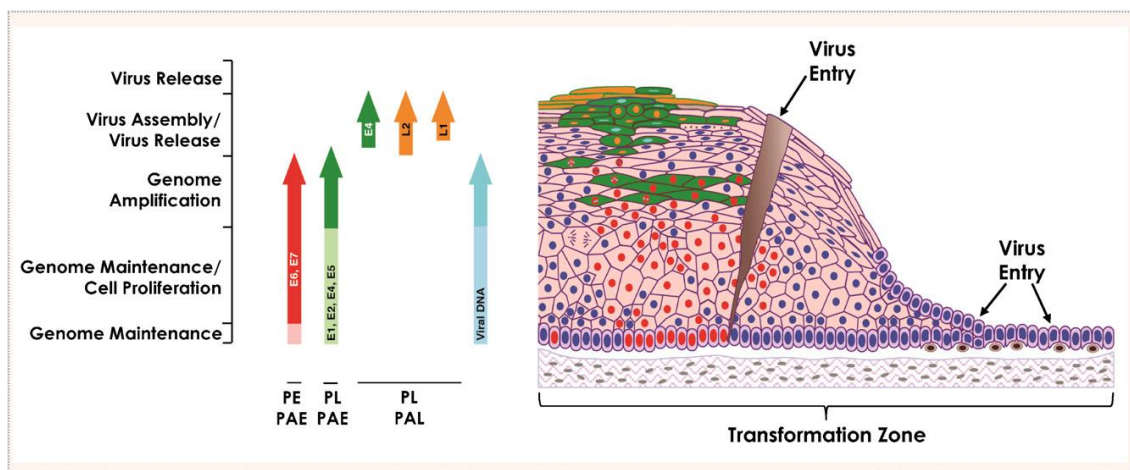
los linfocitos T citotóxicos atacarán y destruirán la célula infectada promoviendo la regresión de la lesión cito-histopatológica.

Es probable que a este nivel las células infectadas por el HPV 56 (siguiendo con el ejemplo), y gran parte de las infectadas por el HPV 16 sean eliminadas, aunque un porcentaje de estas últimas podrían escapar a este control de la inmunidad celular.

Se sabe que los HPV de alto riesgo tipos 16 y 18, ven favorecido su tropismo al lograr evadir no sólo las defensas intrínsecas del ciclo celular sino los mecanismos de presentación antigénica de la inmunidad celular, logrando así evadir la respuesta citotóxica de los linfocitos CD8 y perpetuando su presencia en la célula infectada.

Comienza de este modo un proceso de persistencia en el interior celular y la progresiva expresión de las proteínas virales tempranas y tardías con formación de más partículas virales y la colonización del epitelio (figura 29).

**Figura 29. Ciclo vital de los HPV de alto riesgo en el epitelio cervical.**



En este estado los cambios morfológicos celulares e histológicos se podrán identificar con los propios de la patología de alto grado y las posibilidades de regresión de estas lesiones disminuyen drásticamente.

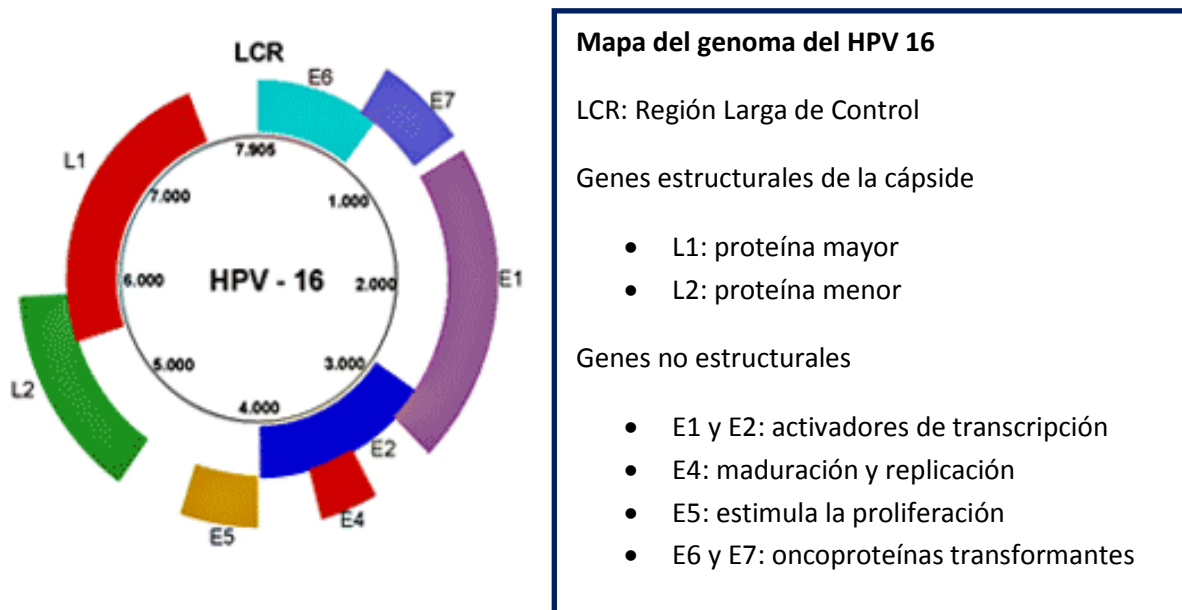
En ausencia de tratamientos escisionales que reduzcan el volumen celular infectado, dando una segunda oportunidad a la inmunidad celular, las

probabilidades de que esta estirpe celular acumule más errores genéticos y se transforme en un tejido tumoral son muy elevadas.

### 3.5. Genoma y Clasificación del HPV

Los papilomavirus humanos (HPV), miembros de la familia Papovaviridae, son pequeños virus de DNA circular encapsidado de escasamente 8.000 pares de bases (figura 30).

**Figura 30. Estructura genómica de los papilomavirus humanos**



Su estructura genómica es compartida por los más de 100 tipos secuenciados hasta la fecha, y consta de varios genes u ORF (Open Reading Frames) de dos tipos diferentes: hasta ocho genes de expresión temprana (E1-E8) (early), cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación y replicación viral; y dos genes de expresión tardía (L1, L2) (late), cuya expresión genera las proteínas para el





Se pueden agrupar en grandes géneros, en primer lugar el género Alfa-papilomavirus, de gran importancia clínica ya que agrupa a los HPV que están asociados con lesiones mucosas, genitales y no genitales. Otros géneros son los Beta, Gamma y Mu papilomavirus, que agrupan a los HPV asociados a lesiones cutáneas, benignas o malignas [40-43].

Hasta el momento han sido secuenciados total o parcialmente los genomas de más de 100 HPV.

Los HPV se clasifican en tipos, subtipos y variantes según la homología de la secuencia de bases del DNA del gen L1. Los distintos tipos de HPV tienen entre ellos una diferencia superior al 10% de su genoma, los subtipos entre 2-10% y en las variantes la diferencia es menor del 2%.

De todos ellos aproximadamente 40 tipos han sido aislados de lesiones del tracto genital inferior, y entre 15 y 20, según diferentes estudios, han sido detectados en carcinomas.

Según su riesgo oncogénico se clasifican en HPV de alto riesgo (HPV-AR) y HPV de bajo riesgo (HPV-BR) (figura 32).

**Figura 32. Clasificación de los HPV en función de su riesgo de transformación neoplásica.**

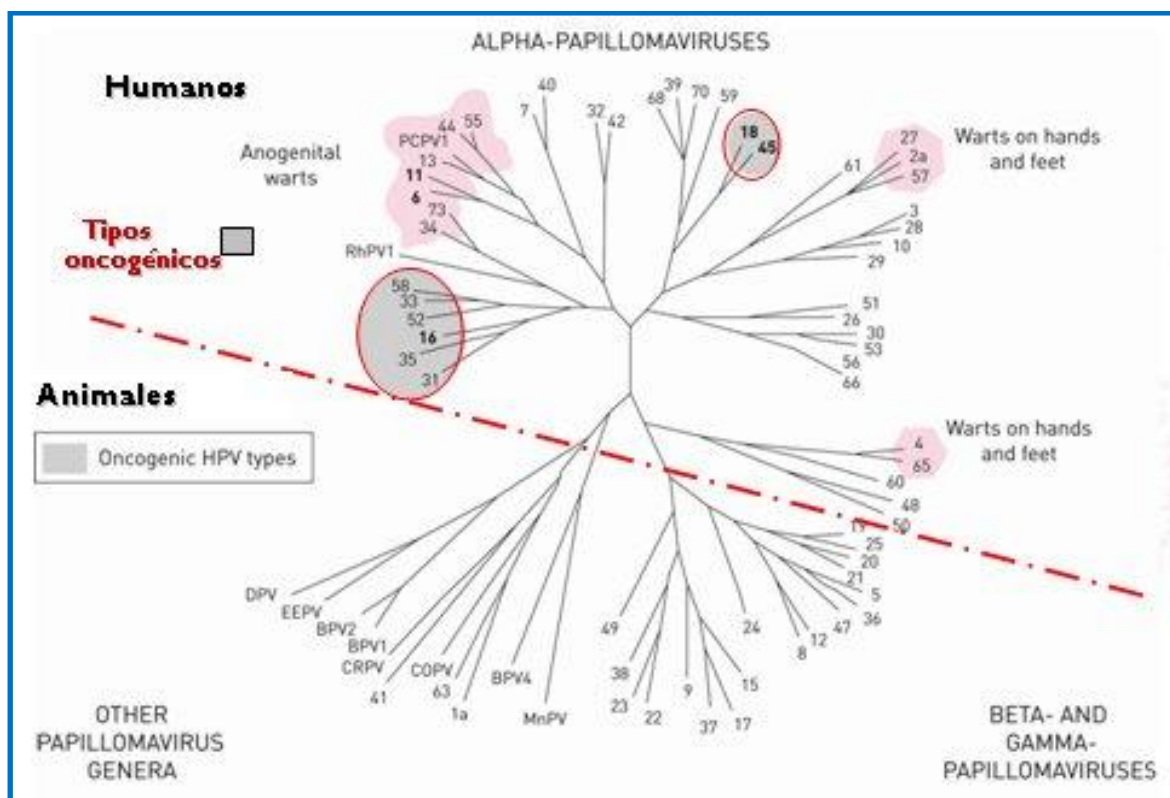
CLASIFICACIÓN DE LOS PAPILOMAVIRUS GENITALES
<b>Alto Riesgo:</b> 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82
<b>Posible Alto Riesgo:</b> 26, 53, 66
<b>Bajo Riesgo:</b> 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, CP6108

La creciente disponibilidad de técnicas de biología molecular a gran escala ha permitido la secuenciación de grandes series de muestras infectadas, lo que ha revelado diferencias polimórficas en los genes de expresión temprana E6 y en la región de control LCR.

Estas diferencias conllevan prometedoras expectativas ya que ciertas variantes parecen implicarse de forma diferencial en la progresión de la patología.

El conocimiento de la relación filogenética entre los diversos tipos de HPV de alto y bajo riesgo oncogénico (figura 33) permite explicar las distintas reacciones cruzadas observadas al emplear las vacunas frente al HPV para la prevención del cáncer de cérvix y sus lesiones precursoras, de gran importancia para ampliar su capacidad preventiva.

**Figura 33. Árbol filogenético de tipos de HPV anogenitales según riesgo oncogénico.**



#### 4. CRIBADO DEL CÁNCER DE CÉRVIX

La medicina preventiva establece tres tipos de prevención de una enfermedad o de sus complicaciones

**Prevención Primaria:** basada en estrategias dirigidas a:

- Identificar y evitar los factores de riesgo de adquirir la enfermedad
- Administrar fármacos que impidan su aparición (quimioprevención)
- Proteger al individuo mediante la inducción de inmunidad específica (vacunación) frente a los agentes etiológicos.

**Prevención Secundaria:** detección precoz o **cribado**. Dirigida a identificar la enfermedad en una fase subclínica y tratarla para evitar su progresión.

**Prevención Terciaria:** tratamiento de la enfermedad, lo antes posible, con finalidad de curarla y evitar las complicaciones de la evolución natural de la misma.

El **cribado** es la estrategia que permite identificar a las personas que se encuentran asintomáticas con el objetivo de detectar a aquellas con riesgo de padecerla.

Un test de cribado no es una prueba diagnóstica sino que trata de clasificar a las personas como “probables” o “improbables” de sufrir la enfermedad. El riesgo de sufrir la enfermedad ha de ser suficientemente alto para justificar posteriores actos diagnósticos. Y es necesario que en la historia natural de la enfermedad existan formas subclínicas que precedan a la enfermedad, las cuales sean susceptibles de ser detectadas con ese test de cribado.

Para desarrollar estrategias preventivas frente a una enfermedad, esta debe presentar unos criterios:

- Tener una elevada prevalencia
- Representar un problema importante de salud para la comunidad
- Conocerse su historia natural
- Disponer de una técnica aplicable a grandes masas de población

- Disponer de una red asistencial capaz de dar respuesta a los casos detectados.

En Europa se han unificado los criterios para el cribado del cáncer, que se recopilaron en unas Recomendaciones del Consejo de la Unión Europea [44]. Sólo tres neoplasias reúnen los criterios aceptados:

- Cáncer de cérvix (citología)
- Cáncer de mama (mamografía)
- Cáncer colorrectal (sangre oculta en heces-colonoscopía)

### **Características del test de cribado**

El test de cribado no está diseñado para realizar un diagnóstico, sino para clasificar a una población asintomática como “probables” o no de tener o poder desarrollar un cáncer.

El test ideal debe reunir las siguientes características:

- Sencillo
- Inocuo
- Fácil de usar
- Económico
- Validado clínicamente

### **Justificación del cribado del cáncer de cérvix**

Las neoplasias cervicales, intraepiteliales e invasoras, siguen siendo un problema no resuelto en España, por el que fallecen dos mujeres cada día. El principal motivo es no haber practicado un cribado citológico adecuado, como ocurre en el 80% de las mujeres españolas que desarrollan un cáncer de cérvix, lo que justifica mejorar las estrategias de prevención.

Los programas de cribado de cáncer de cérvix organizados comenzaron a implantarse en Europa en los años 60 en Finlandia, Luxemburgo y Suecia.

La citología de Papanicolau (o citología convencional) fue la primera prueba diagnóstica empleada para la detección precoz del cáncer de cuello uterino y sigue siendo el método de referencia en la mayor parte de los países europeos [45].

Aunque su eficacia no llegó a demostrarse en estudios randomizados han sido muchas las publicaciones basadas en la comparación de cohortes de población en relación con el cribado (realizado o no realizado) que han establecido el valor real de la prueba y su repercusión en términos de salud de la población, al reducir significativamente las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer de cérvix [46].

### **Estrategias de cribado**

El cribado del cáncer de cérvix se enmarca en las políticas de Salud Pública, con un ámbito de prestación en el entorno de la atención primaria.

De la citología cervical debemos esperar un resultado de normal o anormal, no un diagnóstico de certeza. Las citologías anormales detectan mujeres que podrían tener una lesión cervical. Si tras ser examinadas mediante colposcopia y biopsia se diagnostica una neoplasia intraepitelial (CIN) 2 ó 3, o cáncer, y son tratadas debidamente, se estará interrumpiendo la historia natural de la enfermedad hacia un cáncer invasor y se evitará la consiguiente mortalidad asociada, lo cual es el objetivo final.

Obviamente una citología aislada no puede ofrecer garantías individuales, sino que su empleo dentro de un programa de cribado repercute a medio-largo plazo en la disminución de la mortalidad por la enfermedad en la población cribada. Para conseguirlo es preciso que la cobertura del programa supere el 70-80% de la población y se mantenga de forma continuada, por lo que debe asegurarse una adecuada financiación.

La rentabilidad del programa de cribado se define en función de los siguientes parámetros [47]:

- Eficiencia (relación coste-beneficio)
- Lesiones preinvasoras diagnosticadas
- Años de vida ganados al no fallecer por un cáncer cervical

Existen diferentes estrategias para aplicar un programa de cribado

### **Cribado Poblacional**

Es una iniciativa de Salud Pública, cuyo objetivo es reducir la mortalidad por cáncer de cérvix en la comunidad, mediante la aplicación sistemática de una técnica de cribado previamente validada (citología).

Tiene una estructura propia e independiente de la medicina asistencial.

Está dirigido a una población concreta, definida por el sistema de Salud Pública, y se realiza de forma periódica y continuada, con citación activa a todas las mujeres inscritas en el censo.

La citología se realiza en Atención Primaria, existiendo protocolos bien definidos para derivación a Atención Especializada que dispone, asimismo, de protocolos para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los casos detectados.

### **Cribado Oportunista**

No tiene protocolo definido. Es iniciativa del profesional que aprovecha cualquier actividad asistencial para practicar una citología a la mujer, en la misma consulta.

El interés del profesional no es toda la población, sino las pacientes que atiende.

El principal defecto de esta estrategia es no cumplir con el principio de equidad, pues no da cobertura preventiva a la mujer que no acude al sistema sanitario, resultando ineficiente en la práctica, pues no alcanzará nunca el 70-80% de cobertura exigible [48].

## **Cribado Espontáneo**

Iniciativa personal de la mujer que debidamente informada solicita una atención de carácter preventivo de su salud, que incluye la patología cervical.

La mujer acude en busca de un diagnóstico, y se le debe ofrecer la máxima garantía para descartar una enfermedad con los medios pertinentes. La asistencia adecuada se evalúa en términos de eficacia para conseguir el objetivo.

El principal defecto de esta estrategia es una reiteración innecesaria de exploraciones en mujeres de riesgo bajo.

Habitualmente los cribados oportunista y espontáneo se practican en el marco de la medicina asistencial. La confusión nace por la mezcla de dos conceptos de salud pública, prevención y asistencia. Es preciso tener presente en todo momento la estrategia de cribado que se emplea, diferenciando si es “poblacional”, que se rige por términos de eficiencia teniendo por objetivo la reducción de la mortalidad, “oportunist”, realizado en atención primaria que aspira a ser eficiente, o “espontáneo”, realizado por el especialista en el contexto de una visita de control de salud, donde se busca la eficacia.

## **Cribado Mixto**

Cribado oportunista en el que se hace un esfuerzo especial por captar aquellos individuos no cribados que presentan criterios de riesgo y/o tienen dificultades de accesibilidad al sistema sanitario.

Es la estrategia adoptada por las autoridades sanitarias españolas, justificado por la baja prevalencia del cáncer de cérvix, lo que haría ineficiente un cribado poblacional.

La Unión Europea recomienda como mejor estrategia para prevenir el cáncer de cérvix el cribado poblacional, organizado, controlado y continuado en el tiempo [44], ya que es la única que puede garantizar los parámetros exigibles de equidad, amplia cobertura, eficacia y eficiencia.



El objetivo es que su aplicación sistemática reduzca la mortalidad causada por la enfermedad en la población cribada.

Sin embargo en Europa no hay un organismo que regule medidas organizadas para el cribado en sus territorios. Sólo 5 países (Finlandia, Luxemburgo, Holanda, Suecia, Reino Unido) tienen un cribado poblacional. En el resto, donde las cifras de mortalidad por cáncer de cérvix son muy heterogéneas, el cribado es oportunista o espontáneo, existiendo grandes diferencias en el acceso y cobertura de la citología e incluso en algunas regiones europeas el acceso al cribado sigue siendo complicado [49].

Se debe reconocer que el cribado es una actividad costosa que sólo ha funcionado bien en países desarrollados pero se muestra totalmente ineficiente e impracticable en países en vías de desarrollo, donde las infraestructuras necesarias no están preparadas.

A pesar de sus beneficios, el cribado, tal y como se practica actualmente en nuestro medio, ha mostrado problemas para su introducción y cobertura.

En España el estudio Afrodita ha evidenciado estas limitaciones [50], por un lado pone de manifiesto el serio problema de la cobertura, parámetro fundamental de calidad del cribado, definiendo un perfil de mujeres con dificultades de acceso a la citología; mayores de 55 años, de ámbitos rurales, de segmentos sociales más desfavorecidos, con residencia en determinadas comunidades autónomas; y por otro, la ineficiente tendencia a la sobreutilización de la citología: mujer de entre 25-40 años, de clase social media-alta y con residencia en áreas metropolitanas. Esto refleja que en España se ha potenciado en exceso la “revisión” ginecológica asociándola a la realización de la citología, sin generar programas eficientes de cribado poblacional y sin explicar sus limitaciones, en especial los falsos negativos.

#### 4.1. La citología

##### **Reducción de la incidencia y mortalidad por cáncer de cuello uterino**

En los últimos 50 años el cribado citológico ha conseguido reducir la morbi-mortalidad por cáncer de cérvix en un 70-80% en los países donde se ha aplicado con una estrategia poblacional con cobertura suficiente y continuada [51,52,53].

Se ha llegado a aseverar que la citología es la mejor técnica preventiva que se ha utilizado en la medicina.

El cribado oportunista-espontáneo es más caro y menos eficaz que el poblacional en términos globales. Mientras el cribado poblacional reduce la mortalidad en un 90% (cuando se hace con una cadencia cada tres años), el oportunista lo hace tan sólo en un 40% (figura 34),[54].

**Figura 34. Eficacia del Cribado Citológico según estrategia**

<b>Estrategia de Cribado</b>	<b>Intervalo entre</b>	<b>Disminución del</b>
<b>Citológico</b>	<b>cribados</b>	<b>riesgo de cáncer</b>
Poblacional	3 años	90%
	4 años	87%
	5 años	83%
Oportunista	--	40%

## Limitaciones del cribado con citología cervical

Al valorar la efectividad de un programa de cribado podemos observar que la citología tiene algunas limitaciones (figura 35).

**Figura 35. Limitaciones del Cribado Citológico**

- Inasistencia al programa de cribado
- Los resultados dependen de la calidad de la toma
- Método de interpretación subjetivo
- Lectura monótona, puede causar errores de interpretación
- Baja sensibilidad para CIN 2+, requiere repetición del cribado
- Baja especificidad, demasiadas mujeres con citologías ASCUS/LSIL
- No detecta bien las lesiones glandulares precursoras
- No disminuye la incidencia de adenocarcinoma
- Requiere un seguimiento estricto después de un resultado anormal

La primera causa de fallo es la **inasistencia** o, lo que es lo mismo, la tasa de cobertura de la población [55]. Para conseguir un impacto sobre la mortalidad deben conseguirse coberturas por encima del 70% de la población.

La mayoría de las pacientes a las que se les diagnostica un cáncer de cérvix en aquellos países con un cribado poblacional establecido, nunca habían participado en él. En Holanda hasta el 80% de los casos de cáncer incidente se dan en mujeres con historia de cribado deficiente, el 50% de ellas no se han realizado cribados y el 30% lo han hecho de manera irregular, manteniéndose estable el porcentaje de mujeres no cribadas en los últimos diez años [56].

Estas cifras son coherentes con las publicadas en España [57], donde el 80% de las mujeres a las que se les diagnostica un cáncer cervical no tenía

un estudio citológico adecuado. El objetivo prioritario del cribado será por tanto captar a estas mujeres.

Otra de las limitaciones que presenta la citología es la **sensibilidad** que tiene para detectar CIN2+, que es muy variable, con una media del 53%, pero que va desde un 18,6% a un 76,7%. Esta cifra media es la que reflejan los estudios más recientes de laboratorios europeos y norteamericanos [58], siendo poco aceptable para un test de cribado.

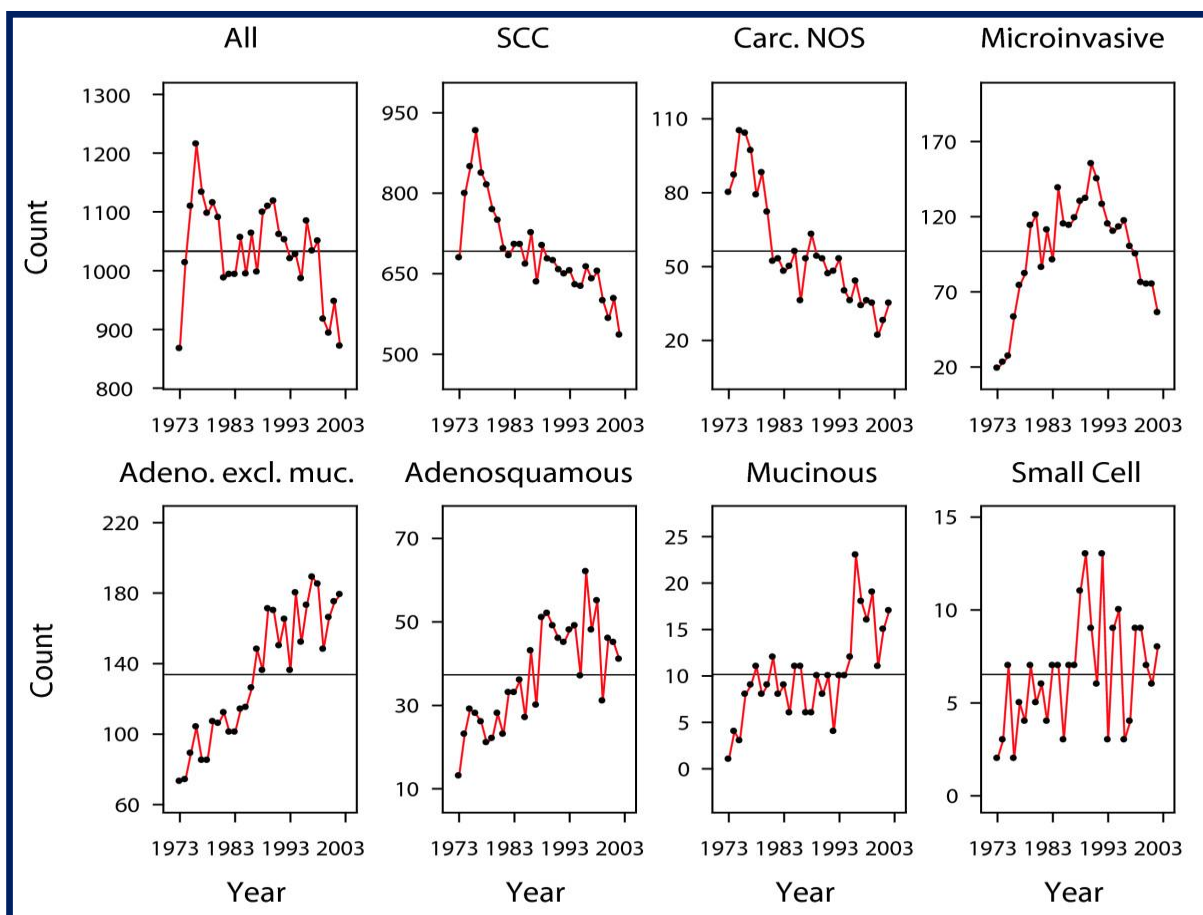
La repetición periódica de la citología corregiría esta limitación para detectar CIN2+. Así mismo, trabajos ya antiguos demostraron que el empleo conjunto de la citología junto a la colposcopia aumenta la sensibilidad hasta cifras cercanas al 100% [59].

La sensibilidad de una citología depende directamente de la calidad de la muestra obtenida y de la lectura monótona de los frotis y su lectura subjetiva en el laboratorio, lo que conlleva una baja reproducibilidad de los resultados interlaboratorio.

Por otra parte, la citología convencional tiene limitaciones importantes para detectar lesiones glandulares precursoras, y **no disminuye la incidencia de adenocarcinoma**, que representa un 20-25% de los cánceres cervicales, y tiene un peor pronóstico.

En las últimas décadas se ha observado un aumento de la incidencia del adenocarcinoma y el carcinoma adenoescamoso cervical, especialmente entre las mujeres jóvenes, a la vez que han disminuido el cáncer cervical en general y los carcinomas escamosos (figura 36). Este hecho se atribuye a la ineficacia del cribado convencional para detectar el adenocarcinoma, planteándose nuevas alternativas de cribado que proporcionen una mayor sensibilidad [60, 61].

**Figura 36. Evolución de la incidencia de cánceres cervicales, según tipo histológico (1973-2003)**



Las nuevas técnicas disponibles para aumentar la sensibilidad de la citología convencional, como la citología en medio líquido, o la lectura automatizada, no han mejorado los resultados.

La ventaja que presenta la citología líquida es que permite una lectura mejor y más cómoda del extendido, evitando gran cantidad de “no valorables”, sin embargo una revisión sistemática de los trabajos publicados concluyó que no mejoraba la sensibilidad global [62]. Su principal utilidad es poder utilizar el medio conservante para análisis moleculares, como por ejemplo para el estudio de DNA de HPV.

La **especificidad** de la citología para detectar CIN2+ es además subóptima, ya que detecta demasiadas mujeres con ASCUS/LSIL.

Tampoco en este sentido se ha demostrado mayor precisión diagnóstica para la citología líquida [62].

En una encuesta realizada a diversos laboratorios de citología españoles acreditados, que incluye más de 400.000 citologías, demostró una tasa global de resultados citológicos anormales del 3,5%, de los cuales sólo el 13% correspondía a lesiones HSIL o ASC-H, mientras que el 87% restante eran ASC-US o LSIL [63], los cuales, si bien la mayoría corresponden a cambios citológicos por infección HPV, pueden esconder, en un 20-25% de los casos, lesiones más avanzadas, por lo que obliga a iniciar un estudio diagnóstico que no se confirma en un alto porcentaje de casos.

Todo esto puede explicar el coste anual tan elevado que supone el cribado y tratamiento de las lesiones intraepiteliales en España; hasta 622 millones de euros en cribado y 147 millones de euros en tratamiento [64].

Como conclusión, las principales limitaciones de la citología para el cribado del cáncer de cérvix son:

- Baja sensibilidad, que obliga a la repetición de la citología con intervalos que pueden hacerla ineficiente.
- Baja especificidad, debido al elevado número de lesiones de bajo grado, que requieren un estudio diagnóstico o seguimiento.
- Poca sostenibilidad del cribado citológico en muchos países en vías de desarrollo, donde tiene lugar el 80% de los cánceres cervicales a nivel mundial.

Debido a las limitaciones de la citología y la poca eficacia que ésta tiene para la detección precoz del adenocarcinoma, han surgido nuevas técnicas encaminadas al cribado del cáncer de cérvix, que basándose en el conocimiento de la relación causal entre la infección persistente por el HPV y el carcinoma de cérvix, pretenden ser más sensibles y se centran en torno al agente etiológico.

## **4.2. Marcadores Moleculares**

Las razones que justifican la utilización clínica de los test basados en la biología molecular de la infección por HPV son varias:

- La infección por HPV-AR es la principal causa primaria del cáncer de cérvix.
- Es necesaria la persistencia de esa infección para el desarrollo y mantenimiento de la CIN y su progresión a cáncer invasor.
- La CIN 2/3 HPV-AR + es el precursor del cáncer cervical.
- En la práctica no hay cánceres HPV-AR negativos.

Existen tres tipos de pruebas moleculares disponibles para uso clínico, que han sido validadas en ensayos controlados:

- Test basados en el análisis del DNA de los HPV de alto riesgo oncogénico, bien mediante captura de híbridos (HC2), o mediante PCR de consenso.
- Test basados en el análisis de proteínas oncogénicas (RNA<sub>m</sub>, p16INK4a).
- Nuevos marcadores moleculares, como la tinción dual p16/Ki-67.

Se ha de resaltar la importancia que tiene conocer los conceptos de exactitud analítica y exactitud clínica, claves para poder entender las ventajas e inconvenientes y limitaciones de los test en el cribado, su ámbito principal de aplicación clínica.

### **4.2.1. Test de Detección de DNA de HPV**

La detección del DNA del HPV mediante técnicas de biología molecular se basa en la especificidad de la complementariedad que existe entre los ácidos nucleicos. Una secuencia de DNA tiene la capacidad de hibridar específicamente con otros DNAs o RNAs de modo tan específico que a una determinada temperatura solamente se forman híbridos si el 100% de las bases son complementarias. El modo de detección de estos híbridos, la composición de las sondas de DNA, y la existencia o no de amplificación

de la señal marcarán las diferencias entre las diferentes técnicas de detección.

### **Captura de Híbridos**

Este método de detección utiliza sondas de RNA que tienen la capacidad de hibridar con el DNA viral en solución, y ser detectados mediante métodos luminiscentes.

Los métodos modernos de detección, como el Hybrid Capture 2<sup>®</sup> (HC2), a diferencia de versiones previas que se consideraban subóptimas, tienen una adecuada relación entre sensibilidad y especificidad si se establecen límites de señal lumínica.

La utilización de un combinado de sondas de alto riesgo (concretamente 13 tipos) y de bajo riesgo (5 tipos), permiten la detección de DNA de esos tipos virales, aunque en la práctica clínica sólo se usa la sonda de alto riesgo.

El principal inconveniente es que no permite distinguir entre los diferentes tipos virales ni la presencia de infecciones múltiples y varios estudios refieren inespecificidades debidas a reacción cruzada entre las sondas de alto riesgo y ciertos tipos virales de bajo riesgo [65-67].

### **Sistemas de detección basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La técnica PCR, al igual que la técnica de captura de híbridos (HC2), utiliza pequeñas sondas de DNA que localizan específicamente secuencias de DNA viral denominadas cebadores o primers.

La diferencia fundamental con otras técnicas se centra en la amplificación en cadena de la región de interés que luego puede ser visualizada por diferentes técnicas (ELISA, electroforesis, detección de láser, etc.).



En este método se combinan, por una parte, la especificidad de la unión de los dos primers, y por otra la sensibilidad que resulta del proceso de amplificación (detección real de 10 copias de DNA viral entre 1 millón de células) [68-70].

### **PCR consenso y PCR específica**

Existen dos tipos de detección de HPV basadas en la técnica de PCR convencional.

La más utilizada es la PCR de regiones de consenso, en la cual se amplifica una región con secuencia muy similar entre todos los HPV para, posteriormente, por métodos de hibridación específica, enzimáticos o de secuenciación de DNA, realizar la tipificación específica del virus.

El método de consenso más popular es el que usa la región común L1, utilizando los primers MY09 y MY11. El amplificado generado es de aproximadamente 450 pares de bases y tiene ciertos inconvenientes como no permitir la detección del tipo 35. Por este motivo se sintetizaron nuevos primers como PGMY09/11 con un relativo aumento de la sensibilidad y especificidad de detección viral, y otros como los GP5/GP6 o su variante mejorada GP5+/GP6+[71,72].

La PCR específica está basada en el diseño de primers específicos para tipos, subtipos o variantes virales y permite ajustar las condiciones de la reacción a sensibilidades de femtogramo, con especificidades que rondan el 100%.

Por otra parte permite la realización de análisis de integración viral, detección de variantes, cuantificación normalizada frente a genes constitucionales, etc. (carga viral relativa al número de células).

## Secuenciación de DNA

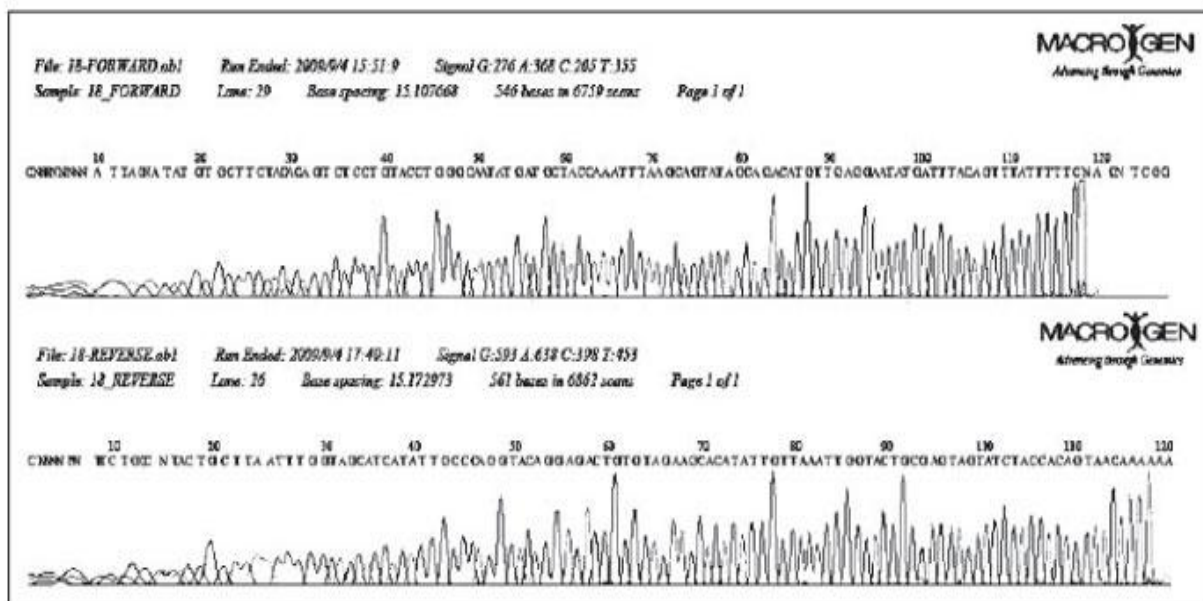
La obtención de la secuencia de nucleótidos que conforma una determinada región del DNA viral se denomina secuenciación, y constituye el patrón de referencia para cualquiera de las técnicas anteriores,

Mediante este método se pueden amplificar o clonar cualquier fragmento del DNA viral y determinar su composición nucleótida. De este modo, enfrentándola a la base de datos que contiene todas las secuencias conocidas de HPV, determinar ante qué tipo, subtipo o variante nos encontramos.

Su principal inconveniente es el coste y la necesidad de contar con laboratorios de alto nivel que dispongan de esa tecnología.

La ventaja, además de suponer una tipificación directa e inequívoca, es que permite distinguir variantes y polimorfismos virales, que en este momento se están considerando variables de riesgo de transformación neoplásica de gran importancia, además de permitir detectar la presencia de nuevos tipos virales (figura 37).

**Figura 37. Secuenciación de DNA viral**



## **Exactitud analítica y clínica de los test de DNA-HPV**

Es fundamental conocer la diferencia entre exactitud analítica y exactitud clínica a la hora de establecer la utilidad de los diversos métodos de detección de DNA de HPV-AR en la clínica asistencial.

Desde el punto de vista analítico el objetivo será la identificación de HPV-AR, sin embargo clínicamente lo que nos interesa es la identificación de enfermedad neoplásica: CIN 2, CIN 3, cáncer invasivo o adenocarcinoma in situ o invasivo (CIN 2+) [73].

### **Exactitud analítica**

La sensibilidad analítica es la proporción de mujeres HPV positivas que son identificadas por un test positivo, y la especificidad analítica es la proporción de mujeres HPV negativas que son correctamente identificadas por un test negativo.

Diferentes estudios han establecido los límites de sensibilidad y especificidad analíticas de cada una de las técnicas y variantes descritas.

La calidad del análisis del DNA estará condicionada, al igual que la citología, por una serie de factores técnicos y de conservación de la muestra, que son determinantes para el resultado.

Cada una de las técnicas va a detectar un rango diferente de HPV y para el grupo común de HPV detectados por todas las técnicas las diferencias de sensibilidad y especificidad son variables aunque equiparables a nivel clínico.

La técnica HC2 precisa la utilización de una solución conservante específica y si la muestra está degradada la reacción no tendrá una buena especificidad.

Igualmente la técnica de PCR consenso disminuye la sensibilidad en muestras con DNA de baja calidad. La PCR específica es menos dependiente de la calidad del DNA y permite analizar muestras conservadas en parafina.

Para obtener la mejor relación entre sensibilidad y especificidad en HC2 se debería aplicar el nivel de corte de 1pg de DNA/ml. Sin embargo, para que la sensibilidad fuese comparable a nivel clínico con la PCR, el punto de corte debería establecerse en 0,2pg/ml, y esto supondría aumentar los falsos positivos y disminuir la especificidad, sobre todo en mujeres jóvenes, en muestras de HPV de bajo riesgo y carga viral elevada.

Respecto a los métodos basados en PCR las técnicas de consenso MY09/11 y GP5+/6+ consiguen una buena correlación en lo que respecta a los tipos detectados por ambas técnicas, sin embargo ciertos tipos virales solamente son detectados únicamente por una de las dos técnicas. La combinación de alguna de estas técnicas con la detección específica de los tipos más implicados en el cáncer de cérvix (HPV 16 y 18), genera unos niveles de sensibilidad y especificidad adecuados para su empleo clínico.

La técnica denominada comercialmente **Amplicor** consiste en la amplificación del DNA objetivo mediante PCR, seguida de hibridación de los ácidos nucleicos amplificados para la identificación de 13 genotipos de alto riesgo oncogénico en células cervicales recolectadas en un medio de transporte. Al comparar este método con HC2 se encontró una concordancia del 84% (índice kappa=0,63). Amplicor registró más muestras positivas para HPV de alto riesgo, con una diferencia del 7% respecto a HC2, lo cual es importante en los casos en los que el estudio del HPV influya en el manejo de resultados citológicos dudosos [74]. Esta diferencia puede deberse a la mayor sensibilidad que proporcionan los métodos basados en PCR y sugiere que estas pruebas pueden tener un uso clínico diferente más óptimo [75].

Por otra parte Amplicor, en combinación con la colposcopia y la citología, ha demostrado tener una gran capacidad predictiva de lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado [76,77] (figura 38).

**Figura 38. Detección de Patología Cervical mediante citología, colposcopia y test de HPV AMPLICOR**

Diagnostic test	OR (95%)	Outcome measure			
		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
<i>CIN I*</i>					
PAP: LSIL*	10.75 (5.60–20.66)	55.0 (46.5–63.6)	89.8 (84.7–94.9)	83.5 (75.6–91.4)	67.9 (61.2–74.8)
PAP: ASC-H*	12.04 (6.34–22.87)	59.7 (51.2–68.2)	89.0 (83.8–94.3)	83.7 (76.1–91.2)	70.1 (63.3–76.9)
PAP: HSIL*	32.69 (4.35–245.22)	19.4 (12.6–26.2)	99.3 (97.8–100.0)	96.2 (88.8–100.0)	56.7 (50.4–62.9)
Colposcopic pattern <sup>#</sup>	8.76 (4.31–17.80)	90.8 (85.7–96.0)	46.9 (38.3–55.5)	61.2 (54.1–63.4)	84.7 (76.4–93.0)
AMPLICOR HPV test	10.16 (5.31–19.41)	89.2 (83.9–94.6)	55.1 (46.8–63.4)	65.2 (58.2–72.2)	84.4 (76.9–91.9)
<i>CIN2–3*</i>					
PAP: LSIL*	7.10 (3.80–13.23)	66.1 (54.3–77.9)	78.4 (72.8–84.1)	48.2 (37.6–58.9)	88.4 (83.7–93.1)
PAP: ASC-H*	8.84 (4.63–16.87)	72.6 (61.5–83.7)	76.9 (71.2–82.7)	48.9 (38.7–59.1)	90.2 (85.8–94.6)
PAP: HSIL*	137.2 (18.02–1043.6)	40.3 (28.1–52.5)	99.5 (98.6–100.0)	96.1 (88.8–100.0)	84.5 (80.0–89.2)
Colposcopic pattern <sup>#</sup>	15.65 (3.70–66.12)	96.5 (91.7–100.0)	36.3 (29.5–43.0)	30.9 (24.1–37.7)	97.2 (93.4–100.0)
AMPLICOR HPV test	14.75 (4.47–48.57)	95.2 (89.9–100.0)	42.4 (35.7–49.2)	33.7 (26.8–40.7)	96.7 (93.0–100.0)
* Consensus diagnosis.					
<sup>#</sup> Abnormal vs. normal.					

Las pruebas **Linear Array (Roche)** e **INNO LiPA** consisten en la hibridación reversa de productos de amplificación obtenidos por PCR con iniciadores biotinilados para HPV con sondas específicas inmovilizadas en un sustrato sólido. La hibridación es detectada mediante reacción colorimétrica.

Con ambos métodos se amplifica un fragmento de la región L1 del genoma viral, de 450 y 65 pares de bases (pb) respectivamente. Al compararlos se encontró una alta concordancia ( $\kappa=0,859$ ), con una compatibilidad de 96,5% en la determinación de genotipos específicos (incluyendo los tipos 16 y 18), incluso en presencia de varios tipos virales, lo que señala que ambas técnicas son reproducibles, precisas y con utilidad clínica en la detección e identificación fiable de un amplio rango de genotipos de HPV, si bien existen diferencias significativas en la detección de algunos genotipos virales poco frecuentes como los tipos 26, 42 y 59.

El Linear Array también ha sido comparado en estudios con la secuenciación del DNA, obteniéndose una alta concordancia (92%) que

pone de manifiesto la elevada exactitud de esta prueba en la tipificación del HPV, la cual se mantiene aún en presencia de infecciones múltiples que presentan dificultades para ser resueltas por la secuenciación del DNA [78].

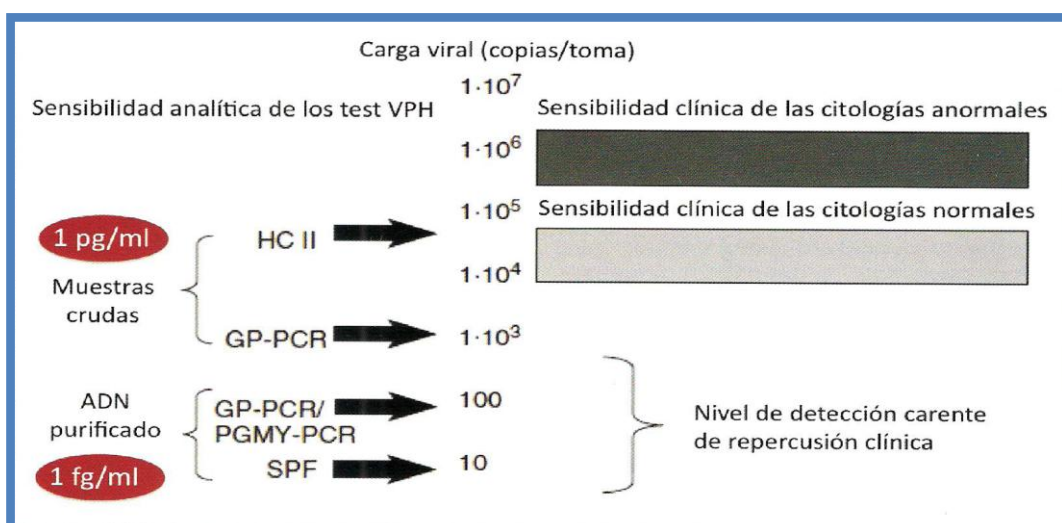
### Exactitud clínica

Desde el punto de vista clínico el objetivo del test es identificar a las mujeres con enfermedad. Así, la sensibilidad clínica es la proporción de mujeres con CIN2+ que son identificadas correctamente por un resultado positivo del test de HPV, y la especificidad clínica la proporción de mujeres sin enfermedad detectadas por un test negativo.

Los test de HPV tienen una alta sensibilidad clínica para detectar CIN2+, pero tienen el inconveniente de que la especificidad no es tan alta. Esto se explica dada la alta frecuencia de infecciones transitorias por HPV, sobre todo en edades jóvenes, que aclararán la infección y no llegarán a desarrollar una neoplasia intraepitelial cervical.

La relación entre sensibilidad analítica y clínica de los test de HPV más utilizados para la detección de lesiones CIN 3 o cáncer se muestran en la figura 39.

**Figura 39. Relación entre sensibilidad analítica y clínica de los test de HPV más utilizados para la detección de CIN3+.**



A la izquierda de la figura los valores de sensibilidad analítica en una estimación del número de copias de virus por toma y a la derecha la correspondencia con la sensibilidad clínica en mujeres con citología normal y anormal.

La HC2, validada para uso clínico, utiliza extractos crudos de HPV y está ajustada con un umbral de positividad de 1 picogramo (pg) por mililitro (ml) equivalente a unas 100.000 copias de virus.

Por el contrario las pruebas de PCR ultrasensibles que utilizan extractos purificados de DNA viral detectan unas 10 copias de virus por ml que equivalen a un femtogramo (fg) (1 picogramo equivale a 1.000 femtogramos).

La utilidad clínica de la determinación de la presencia de HPV no depende solamente de la complejidad del estudio realizado, sino que basa su eficacia en la disponibilidad, reproducibilidad y bajo costo de la misma, lo que permite que se utilice como método de cribado rutinario. Por ello y por la estabilidad del DNA y la potencia de los métodos de detección, la mayoría de las estrategias de diagnóstico de HPV de eficacia probada lo utilizan como diana para el estudio de la infección.

Los diferentes test clínicos validados han demostrado una sensibilidad clínica para detectar CIN2+ del 90-95% [79-81].

El intento por conseguir un aumento de la sensibilidad hasta llegar a cifras cercanas al 100%, mediante el aumento de la sensibilidad analítica, tendría efectos negativos, ya que la ganancia sería muy pequeña y sin embargo provocaría un descenso importante de la especificidad clínica. En un estudio prospectivo usando el test GP5+/6+, sólo el 8% de las mujeres HPV positivas con citología normal desarrollaron enfermedad a los 4 años [73]. Esta baja especificidad de los test analíticamente más sensibles condiciona una sobrecarga innecesaria para la mujer y para el sistema sanitario, a generando en la mujer ansiedad por el diagnóstico, y un aumento del número de consultas, sobrediagnósticos y sobretratamientos, con la consiguiente elevación de costes sanitarios.

Por tanto la exactitud analítica es adecuada para estudios epidemiológicos, pero no lo es tanto para uso clínico. Para que un test de HPV sea utilizado correctamente en la clínica deben seguirse unas pautas que minimicen el número de falsos positivos (test positivo en ausencia de CIN2+) y falsos negativos (test negativo en presencia de CIN2+).

Ante un resultado positivo del test de DNA HPV el riesgo de desarrollar CIN 3 o cáncer está relacionado con el tipo de HPV. A los 10 años el riesgo es del 22% y 17% para los tipos 16 y 18 respectivamente. En los demás tipos de HPV-AR el riesgo es mucho más bajo, siendo de aproximadamente un 1-2% [82].

Existen diversos ensayos controlados randomizados diseñados para validar el test de DNA HPV frente a la citología.

En una revisión de 15 trabajos (12 de ellos empleaban HC2 y otros 3 PCR) sobre el cribado de más de 57.000 mujeres para identificar CIN2+[83], la sensibilidad demostró una sensibilidad del 61,3%, (con una marcada variabilidad entre los diferentes laboratorios, llegando a ir desde un 18 a un 94% de sensibilidad) y una sensibilidad del 91,1% para el test de HPV (con mucha menor variabilidad, entre un 84;8 y un 100). La especificidad de la citología y del test HPV fueron respectivamente un 93,5% y 89,3%.

Por tanto podemos afirmar que el test de DNA de HPV tiene hasta un 30% más de sensibilidad que la citología, pero pierde un 4% de especificidad.

**Figura 40. Citología y Test DNA HPV en la identificación de CIN2+**

		<u>Sensibilidad</u>	<u>Especificidad</u>
<b>1</b>	<b>Citología</b>	<b>53%</b>	<b>96%</b>
	<b>Test de VPH</b>	<b>96%</b>	<b>91%</b>
<b>2</b>	<b>Citología</b>	<b>55.4%</b>	<b>96.8%</b>
	<b>Test de VPH</b>	<b>94.6%</b>	<b>94.1%</b>

**1: Encuesta de Laboratorios de Referencia de Europa y Norteamérica**  
 Cuzick, J.: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical screening.  
 Int J Cancer 2006; 119: 1095 - 101

**2: Aleatorización de 10.154 mujeres de entre 30 y 64 años**  
 Mayrand MH.: Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer.  
 N Engl J Med 2007; 357: 1579 - 88



El valor predictivo negativo (VPN) conjunto de citología + test HPV es del 99,8%, lo que nos permite ampliar con seguridad el intervalo de cribado de las mujeres, llegando hasta intervalos de 6 años [84].

La repetición del cribado en las mismas cohortes de los ensayos comentados previamente ha permitido observar que el test de HPV detecta más precozmente CIN2+ en el primer cribado que la citología [85-88], sin aumentar el número total de casos entre los dos cribados, lo que permite concluir que el cribado primario con test de DNA-HPV y selección con citología de aquellos casos positivos tiene mayor sensibilidad para detectar CIN2+ que la citología convencional (figura 41).

**Figura 41. Estudio POBASCAM. Número de CIN2+ y CIN3+ detectados por citología y HPV (grupo de intervención Citología + DNA-HPV, grupo control Citología + DNA-HPV ciego).**

	Intervention group Baseline cytological and HPV DNA testing							Control group Baseline cytological and HPV DNA testing						
	Normal		Borderline or mild dyskaryosis		Moderate dyskaryosis or worse		Total	Normal		Borderline or mild dyskaryosis		Moderate dyskaryosis or worse		Total
	HPV DNA positive	HPV DNA negative	HPV DNA positive	HPV DNA negative	HPV DNA positive	HPV DNA negative		HPV DNA positive	HPV DNA negative	HPV DNA positive	HPV DNA negative	HPV DNA positive	HPV DNA negative	
Baseline round														
CIN3+ detected	13	2*	14	0	36	3	68	1*	2*	8	1	28	0	40
CIN2+ detected	25	4*	21	2	41	5	98	2*	5*	15	1	37	3	63
Subsequent round														
CIN3+ detected	12	8	3	0	1	0	24	32	16	5	0	1	0	54
After normal cytology/ HPV DNA positive	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1	0	0	0	6
Borderline dyskaryosis or worse/HPV DNA positive	5	3	2	0	0	0	10	17	3	0	0	1	0	21
Borderline dyskaryosis or worse/HPV DNA negative	1	1	0	0	0	0	2	2	3	0	0	0	0	5
Borderline dyskaryosis or worse/no HPV DNA result	4	3	1	0	1	0	9	7	8	4	0	0	0	19
Other†	2	1	0	0	0	0	3	1	2	0	0	0	0	3
CIN2+ detected	15	18	5	0	1	0	39	38	25	7	2	1	1	74
After normal cytology/ HPV DNA positive	0	2	1	0	0	0	3	5	3	1	0	0	0	9
Borderline dyskaryosis or worse/HPV DNA positive	6	7	2	0	0	0	15	14	5	1	0	1	0	26
Borderline dyskaryosis or worse/HPV DNA negative	1	1	0	0	0	0	2	2	3	0	0	0	0	5
Borderline dyskaryosis or worse/no HPV DNA result	6	6	2	0	1	0	15	10	11	4	1	0	1	27
Other†	2	2	0	0	0	0	4	2	3	1	1	0	0	7

\* CIN3+ and CIN2+ cases also include cases that were found by opportunistic screening, this explains the reported cases found after negative test results. † Includes women without an indication for follow-up or referral—ie, normal I/HPV DNA negative, normal without I/HPV DNA test result, inadequate cytology, no cytological result.

\* CIN3+ and CIN2+ cases also include cases that were found by opportunistic screening. This explains the reported cases found after negative test results. † Includes women without an indication for follow-up or referral—ie, normal I/HPV DNA negative, normal without I/HPV DNA test result, inadequate cytology, no cytological result.

Grupo de Intervención: 68 casos de CIN3+ y 98 casos de CIN2+ detectados. Grupo Control: 40 casos de CIN3+ y 63 casos de CIN2+ detectados.

Generalmente la prueba que se debe realizar como cribado es la más sensible disponible, y si ésta es positiva el siguiente paso sería realizar una prueba más específica para poder seleccionar a los sujetos.

Si tenemos en cuenta la baja especificidad que tiene la prueba de DNA-HPV en mujeres jóvenes (dada la alta frecuencia de infección y que la mayoría de esas infecciones son transitorias en esa población), no es apropiado utilizarla como cribado antes de los 30 años. A partir de los 35 años, el test de HPV se ha mostrado incluso más específico que el cribado convencional con citología, lo que permite disminuir el número de pruebas adicionales (colposcopia) y pruebas de seguimiento.

Sin embargo, la determinación aislada de un test de HPV-AR, fuera del cribado, no tiene utilidad clínica, y puede ser motivo de preocupación, además de crear una morbilidad innecesaria.

En conclusión, el test de DNA-HPV proporciona un resultado objetivo y altamente reproducible, muy sensible, con un elevado VPN y de fácil automatización y monitorización. Pero es menos específico que la citología, especialmente en mujeres jóvenes, y no permite distinguir entre infecciones transitorias o persistentes.

Tanto la Guía Europea para el control de la calidad en el cribado de cáncer de cérvix del 2008 [89] como la revisión sistemática del proyecto español DESCRIC del 2007 [90], concluyen que las pruebas de detección de HPV muestran un gran potencial que puede mejorar la efectividad del cribado y reducir el número de episodios del mismo.

Desde la aparición de la Guía Europea se han publicado algunos de los resultados de los grandes ensayos europeos que estaban en marcha y se han actualizado las revisiones sistemáticas y los meta-análisis patrocinados por la Comisión Europea y por el grupo Cochrane de Revisión de Cáncer Ginecológico para evaluar las 4 posibles aplicaciones clínicas de los métodos de detección de DNA HPV [79]. Estas aplicaciones serían las siguientes:

- Triage de mujeres con resultados indeterminados o lesiones intraepiteliales de bajo grado.

- Seguimiento de mujeres con resultados citológicos anormales pero con resultados negativos en la colposcopia/biopsia.
- Predicción de la respuesta terapéutica después del tratamiento de la neoplasia.
- Utilización como método primario de cribado, sólo o en combinación con la citología convencional.

Los resultados de la actualización de los 4 meta-análisis llevados a cabo para evaluar el rendimiento diagnóstico de las pruebas de detección de DNA-HPV en las distintas aplicaciones clínicas se muestran en la figura 42 [79]. En general se encontró que los resultados fueron muy heterogéneos aún después de estratificar mediante el método de determinación (HC2 o PCR). Al comparar los test de detección de HPV con la citología se observó, como ya se ha comentado anteriormente, una mayor sensibilidad por parte de los test de HPV, por lo que los autores la proponen como prueba de elección para el cribado primario del cáncer de cérvix, reservando la citología para el cribado de las mujeres con resultados positivos.

**Figura 42. Resultados de los meta-análisis para evaluar las 4 posibles aplicaciones clínicas de los métodos de detección de HPV (HC2 y PCR)**

Aplicación	Prueba	Resultado	Nº estudios*	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)
Triage ASCUS	HC2	CIN2+	22	93,1 (91,1-95,1)	62,3 (57,6-67,1)
		CIN3+	9	95,5 (92,7-98,2)	60,5 (52,9-68,2)
Triage LSIL	HC2	CIN2+	11	97,2 (95,6-98,8)	30,6 (22,7-38,6)
		CIN3+	6	97,1 (94,0-100)	26,1 (15,1-37,1)
Predicción del fracaso del tratamiento	HC2/PCR	Recurrencia	16	94,4 (90,9-97,9)	75,0 (68,7-81,4)
	HC2	CIN2+	19	89,7 (86,4-93,0)	88,2 (86,2-90,1)
		CIN3+	10/9	90,3 (85,3-95,4)	90,6 (88,7-92,6)
Cribado primario	PCR	CIN2+	7	84,2 (77,0-91,5)	95,1 (93,4-96,8)
	HC2 y citología	CIN2+	8 <sup>a</sup>	99,4 (97,9)-100)	88,2 (85,8-90,5)

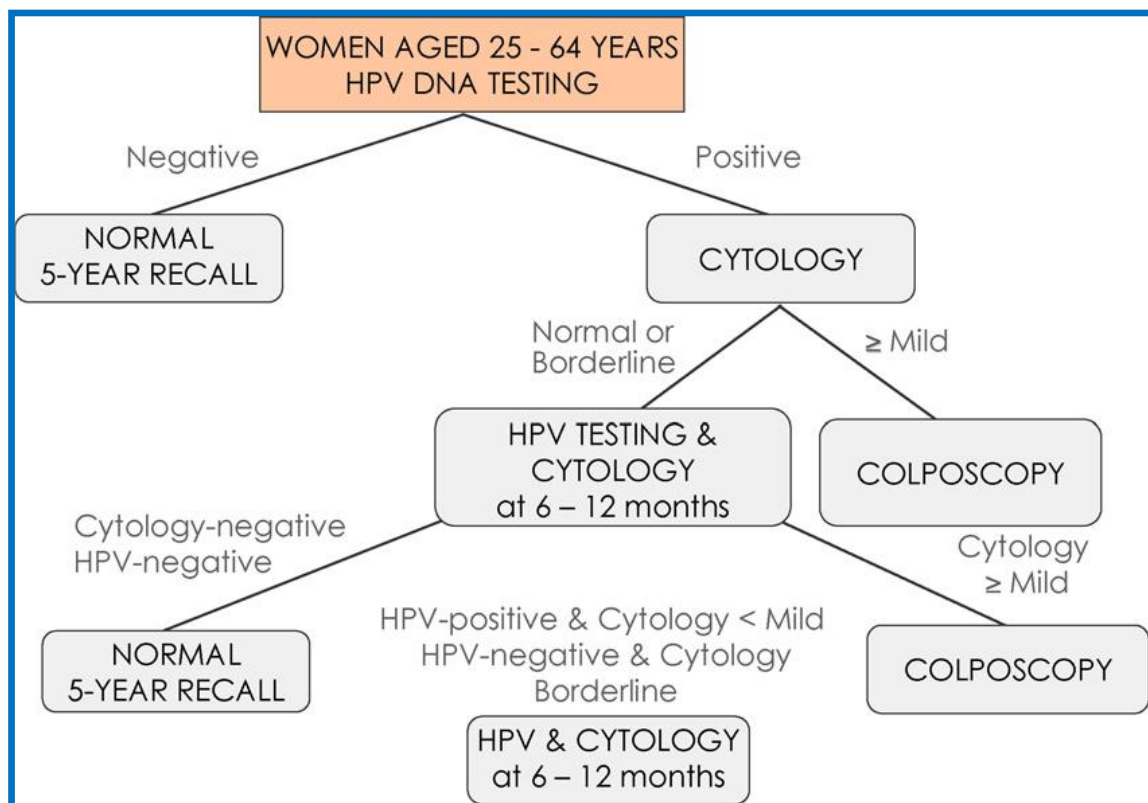
\* Número de estudios incluidos en el metaanálisis

<sup>a</sup> Exclusión de estudios realizados en la India y Zimbabwe

En función de los resultados de los estudios incluidos en los anteriores meta-análisis, los autores proponen un posible algoritmo diagnóstico (figura 43), pero consideran que puede ser necesario modificarlo para adaptarlo al marco local o a los resultados de otros nuevos métodos de detección de HPV (tipado HPV16 y 18, mRNA, detección de la sobreexpresión del gen supresor de tumores p16INK4a). Existe también la posibilidad de que los protocolos puedan variar tras los resultados de los ensayos clínicos que están en marcha para evaluar la efectividad de la vacuna del papilomavirus.

No obstante, en la actualidad, el cribado se recomienda tanto en mujeres vacunadas como no vacunadas.

**Figura 43. Algoritmo diagnóstico propuesto por el grupo de Cuzick et al.**



#### 4.2.2. Otros Marcadores Moleculares

A la vista de todo lo expuesto hasta el momento parece lógico que se estén investigando y desarrollando otras estrategias que permitan identificar a aquellas pacientes que realmente presentan un alto riesgo de sufrir transformaciones carcinogénicas y desarrollar un cáncer invasivo.

Uno de los mejores indicadores de esa capacidad de transformación neoplásica en las muestras cervicales sería la detección de los niveles de proteínas oncogénicas producidas por el HPV.

Se han de tener en cuenta una serie de conceptos generales y limitaciones antes de valorar la idoneidad del análisis proteico frente a la determinación del DNA viral.

La cantidad de proteína oncogénica, traducida “in vivo” en la célula, es dependiente de múltiples factores:

- Tipo viral
- Cantidad de virus (carga viral)
- Tasa de transcripción de RNA
- Presencia de moduladores de transcripción (corticoides, hormonas, etc.)
- Integridad del DNA
- Activación o inactivación de promotores y reguladores

La vida media “ex vivo” de la proteína, o del RNA que la traduce, puede ser muy limitada, modificando sustancialmente los resultados en función del manejo y la calidad de la muestra.

Hay varias preguntas que debemos contestarnos antes de seguir.

¿Es dependiente la tasa de expresión del tipo concreto de HPV-AR?, ¿significa la presencia de DNA viral de HPV-AR que las proteínas oncogénicas se están expresando?, ¿es dependiente la expresión de estas proteínas de la cantidad de virus presente en la muestra?.

Si la respuesta a estas preguntas fuese negativa invalidaría la capacidad de la detección de HPV-AR como predictor de riesgo de lesión cervical, dado que la presencia de un tipo viral de alto riesgo, independientemente de la cantidad o tasa de infección detectada, no supondría necesariamente la expresión de las proteínas capaces de afectar al ciclo celular y provocar la inmortalización celular, y con ello, su valor para establecer grupos de riesgo.

Para responder a las dos primeras cuestiones se han realizado diversos estudios de expresión génica, que demuestran que la producción de proteínas oncogénicas E6 y E7, en aquellos casos en que el virus permanece no integrado, es decir episomal, está invariablemente conservada con independencia del tipo viral que la codifique y que se modifica únicamente en respuesta a señales moduladoras de sus promotores dependientes de la fase de la infección.

De este modo, salvo algunas excepciones, la forma no integrada del virus expresa cantidades constantes de E6 y E7 una vez que la infección se hace persistente.

Por el contrario, cuando el DNA del HPV se encuentra integrado, se produce la desaparición de la región E2 del HPV-AR hace que los promotores de E6 y E7 se desregulen positivamente e incrementen la producción de RNA mensajero, y la traducción de éste a proteínas oncogénicas [91].

Podemos afirmar, por tanto, que la cantidad de proteínas oncogénicas puede relacionarse de manera fidedigna con la capacidad de transformación celular individual de cada paciente.

Una forma de evaluar la capacidad de expresar proteínas oncogénicas es medir la expresión del mRNA específico que es precursor necesario de la expresión de esas proteínas [92].

Las técnicas de detección del HPV, incluidas dentro del término marcadores moleculares, que más están siendo investigadas son la detección de mRNA que codifica para proteínas E6 y E7 de HPV-AR, la proteína p16INK4a, la tinción dual p16/Ki67 y marcadores de metilación.

#### **4.2.2.1. Cuantificación de mRNA que codifica para las proteínas oncogénicas de los HPV de alto riesgo**

Como ya se ha expuesto previamente, la transcripción de los genes E6 y E7 de los tipos de HPV de alto riesgo (HPV-AR) y la producción de oncogenes funcionales E6 y E7 se reconocen como un paso necesario para la conversión preneoplásica de las células.

Los oncogenes E6 y E7 están presentes en la práctica totalidad de los carcinomas de cérvix [93,94] y se los reconoce como responsables de la iniciación y la evolución a tumores invasivos. Estos oncogenes ocasionan la degradación de las proteínas supresoras de tumores p53 y Rb e interfieren en la regulación del ciclo celular.

Las actuales técnicas de determinación de proteína oncogénica incluyen técnicas de cuantificación de RNA mensajero, y no de DNA, ya que la cantidad de mRNA es proporcional a la cantidad de proteína oncogénica que se está expresando dentro de la célula.

La **cuantificación del mRNA de E6 y E7** es por tanto un **marcador de la expresión proteica de E6 y E7**. Su detección es un indicador de la integración y expresión de estos genes y permite identificar células con potencial real de transformación.

Inicialmente la detección de HPV E6/E7 mRNA se realizaba mediante métodos de **transcripción reversa de la PCR (RT-PCR)** no validados. Éstos eran poco reproducibles ya que diferían en los cebadores, la naturaleza de los transcritos identificados, las condiciones de la amplificación, etc.

En la actualidad existen varios métodos de detección comercializados.

##### **PreTec HPV Proofer (Norchip)**

Es una prueba de detección molecular para los 5 tipos más frecuentes de cáncer de cérvix (HPV 16, 18, 31, 33 y 45).

Se trata de una técnica cualitativa, basada en la amplificación en tiempo real de los ácidos nucleicos (NASBA), y está diseñada para ser compatible con la muestra para citología líquida. Presenta control interno y dispone de autorización para su comercialización en Europa.

### **APTIMA HPV Assay® (GenProbe)**

Es una técnica igualmente cualitativa, pero está basada en la detección de 14 genotipos de alto riesgo oncogénico de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 66, 58, 59, 66 y 68. Asimismo es compatible con los medios conservantes de la citología líquida y presenta un control interno. Fue aprobada para su comercialización en Europa en mayo del año 2008.

### **NucliSENS EasyQ® HPV**

Esta prueba permite la detección directa de la expresión de los factores de riesgo oncogénicos E6 y E7 de los 5 tipos de HPV más frecuentes (16, 18, 31, 33 y 45). Es una técnica de amplificación en tiempo real, y está aprobada en Europa.

### **HPV OncoTect® (Labco)**

El HPV OncoTect® es un método que emplea la técnica de hibridación in situ que permite cuantificar la expresión de los oncogenes E6 y E7. Usa sondas marcadas con fluoresceína (FISH). El análisis de la hibridación se realiza mediante la citometría de flujo y cubre todos los tipos de virus oncogénicos.

En una revisión sistemática se evaluaron 11 estudios sobre detección de mRNA E6 y E7 [6].

De esos estudios nueve evaluaron la efectividad del HPV mRNA para detectar lesiones histológicas CIN2+/CIN3+ y los otros dos investigaron la efectividad para evaluar la progresión citológica de las lesiones. A su vez, otro ensayo evaluó ambos aspectos. Todos los estudios que evaluaron la efectividad diagnóstica fueron de carácter transversal, mientras que los 2 ensayos que evaluaron la efectividad pronóstica fueron de carácter longitudinal.

Aquellos estudios que evaluaron la efectividad diagnóstica de los métodos de detección de E6 y E7 mRNA lo hicieron para tres aplicaciones clínicas diferentes: método primario de cribado (sólo o en combinación con la



citología), triaje de mujeres con resultados positivos en la prueba de DNA y triaje de mujeres con citologías anormales.

Los autores de los diferentes estudios concluyen en su mayoría que la detección del mRNA presenta una sensibilidad similar a la PCR de consenso, pero un mayor especificidad, por lo que el principal interés de las pruebas de HPV mRNA podría residir en el cribado de mujeres con resultados citológicos indeterminados (ASC-US) o lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL) en la citología, para **seleccionar a aquellas mujeres con mayor riesgo de progresión** [95].

#### 4.2.2.2. Proteína p16INK4a

La proteína p16INK4a (p16) es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina que muestra una marcada sobreexpresión en el tejido cervical preneoplásico y neoplásico, lo que lo convierte en un candidato ideal para ser marcador de la enfermedad.

El cáncer de cérvix, recordemos, tiene su origen en infecciones persistentes de diferentes tipos de HPV de alto riesgo. La sobreexpresión de p16 está relacionada con la transformación oncogénica causada por la infección persistente de HPV-AR.

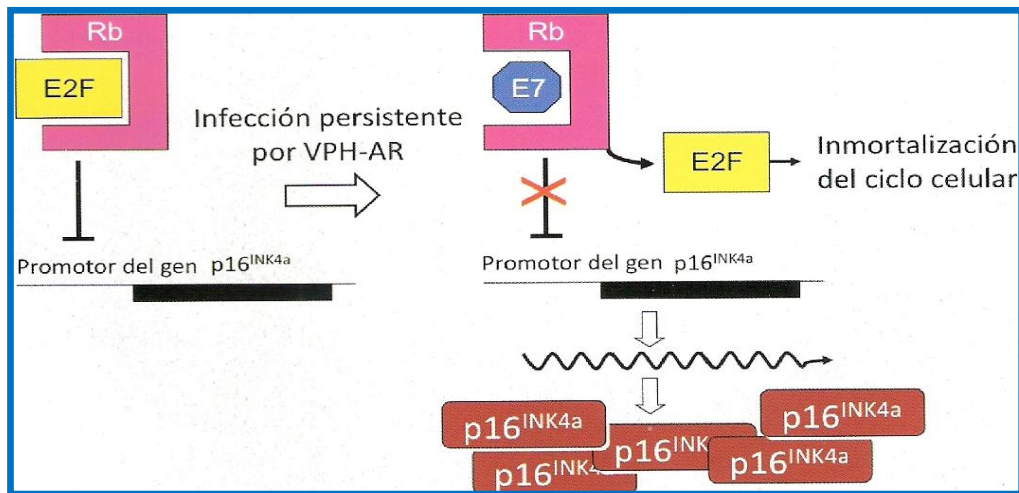
Sin embargo, al contrario que la detección de la pura presencia de HPV-AR, la detección de la **sobreexpresión de p16 indica una inactivación en el control del ciclo celular** mediada por las oncoproteínas del virus del papiloma de alto riesgo, que es la principal causa del cáncer cervical.

La replicación de la célula se controla mediante un complejo mecanismo que implica varias rutas de regulación en la célula. Una de estas rutas, la de la proteína retinoblastoma (Rb), controla la progresión del ciclo celular y por tanto la proliferación de la célula.

En condiciones de normalidad, Rb se une al factor de transcripción E2F, lo que produce un efecto de bloqueo de la transcripción de genes que estimulan la progresión del ciclo celular y su proliferación, pero también la

codificación del gen para el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p16. De este modo la unión del factor de transcripción E2F por la Rb es uno de los mecanismos de control fundamentales para prevenir la replicación y proliferación continua de las células (figura 44).

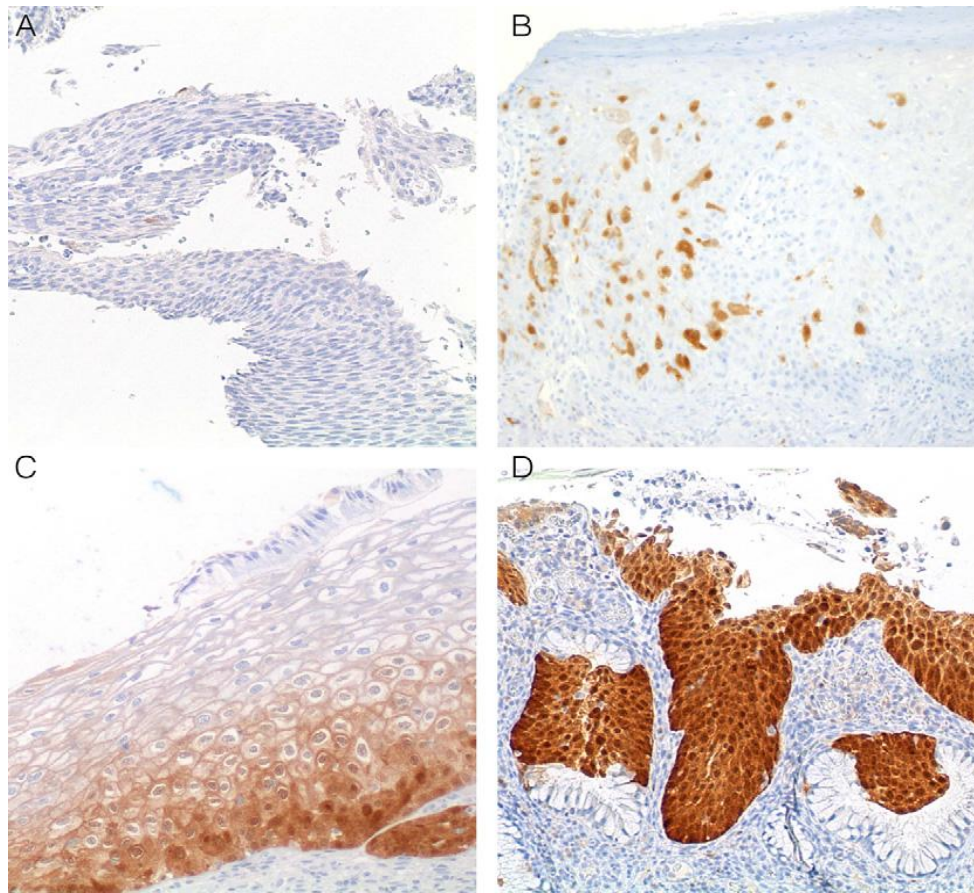
**Figura 44. Mecanismo molecular de la sobreexpresión de p16<sup>INK4a</sup>.**



La infección crónica con virus del papiloma de alto riesgo oncogénico puede dar lugar a una alteración del complejo proteínico funcional Rb-E2F. Una de las proteínas expresadas por el virus dentro de la célula es la proteína oncogénica E7, cuya actividad principal es inhibir la función de Rb. De esta manera Rb no se une al factor de transcripción E2F, lo que produce la transcripción de los genes que promueven la proliferación de la célula. Sólo en las infecciones por HPV que han comenzado un proceso de transformación oncogénica los niveles de la proteína E7 se suelen elevar en las células competentes para replicarse. Por este motivo p16 es un elemento de predicción más preciso para el cáncer cervical que la mera presencia de HPV-AR.

La sobreexpresión de la proteína celular p16 es fácilmente detectable por tinción inmunohistoquímica, y sirve por tanto como biomarcador que puede permitir **identificar de forma inequívoca las células con cambios displásicos en proceso de oncogénesis** cervical inducida por HPV-AR, pero que no depende del tipo de HPV (figura 45).

**Figura 45. Patrones de positividad de p16INK4a en el cérvix uterino.**



- A) Inmunotinción negativa en una mucosa exocervical atrófica.
  - B) Patrón positivo focal en un epitelio escamoso exocervical con paraqueratosis: este patrón debe considerarse como negativo.
  - C) Positividad difusa y basal en una lesión de bajo grado (CIN1).
  - D) Positividad difusa y basal en una lesión de alto grado.
- Sólo los patrones C y D deben considerarse como reacción positiva.

La sobreexpresión de p16 es un marcador directo de transformación oncogénica, independientemente del tipo de HPV-AR, que mejora la especificidad diagnóstica y soluciona los problemas existentes de variabilidad inter e intra-observador al valorar el grado de CIN y su potencial de progresión.

Por el contrario, la sola presencia de HPV no indica con seguridad el desarrollo de un cáncer de cérvix, ya que su prevalencia en mujeres jóvenes puede llegar hasta un 30%.

Por ello las pruebas de HPV tienen una baja especificidad y no son de utilidad para detectar con exactitud la enfermedad, especialmente en mujeres jóvenes. En cambio, la p16 sólo se expresa en las lesiones intraepiteliales que experimentan una transformación oncogénica hacia una neoplasia invasora, y por ello no muestra una mayor prevalencia en mujeres jóvenes.

La determinación de p16 nos informa de la interacción del HPV con las proteínas reguladoras del ciclo celular y constituye un buen candidato a marcador de proliferación neoplásica.

En un estudio reciente [96] se revisaron todas las mujeres en las que se disponía de un estudio histológico (biopsia dirigida por colposcopia o legrado endocervical) y de una determinación molecular de HPV-AR mediante el test HC2 realizado de forma simultánea en la misma visita. En este grupo se identificaron 139 pacientes que mostraron positividad para HPV-AR y que tenían una biopsia simultánea negativa. Una segunda evaluación de las biopsias tras inmunotinción con p16 mostró que 24 de esas 139 pacientes (17,3%) tenían una positividad difusa para p16, siendo reclasificadas como portadoras de una CIN (5 CIN 1 y 19 CIN 2/3), una de ellas asociada a adenocarcinoma in situ. Por el contrario, en ninguno de los casos negativos para p16 se diagnosticó CIN 2/3. Un estudio más amplio posteriormente, de 500 biopsias o conizaciones cervicales, ha ratificado estos resultados [97].

Tenemos evidencias, proporcionadas por estos estudios, de que la tinción inmunohistoquímica para p16 reduce el número de diagnósticos falsamente negativos, por escasa representación de las lesiones de CIN en la muestra, o por patrones morfológicos inusuales como pueden ser la displasia eosinofílica, mejorando así de forma significativa el diagnóstico de lesiones premalignas del cérvix uterino.

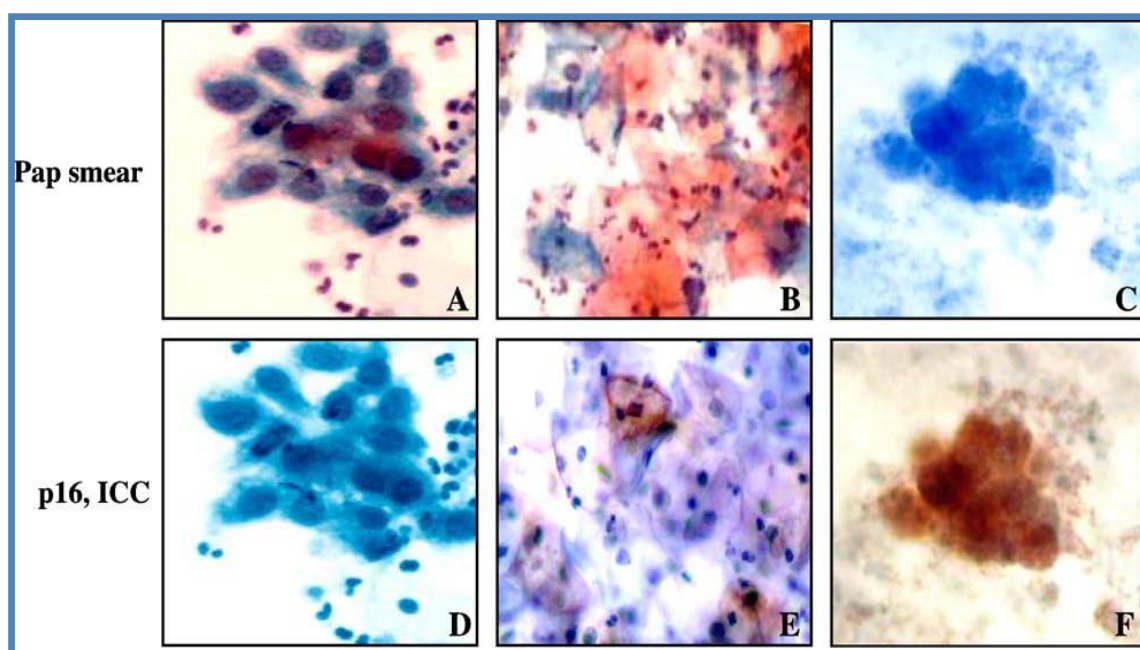
Existen diferentes trabajos que han publicado los valores de sensibilidad para p16INK4a para detectar CIN2+ y CIN3. Los resultados se muestran en la figura 46.

**Figura 46. Sensibilidad de p16INK4a para CIN2+ y CIN3 en diferentes trabajos publicados en la literatura.**

Estudio	Año	Para CIN2+		Para CIN3	
		Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad
Klaes et al. <sup>11</sup>	2002	100%	71%	100%	62%
Hariri y Oster <sup>12</sup>	2007	100%	72%	-	-
Benevolo et al. <sup>13</sup>	2010	96%	66%	-	-
Ordi et al. <sup>14</sup>	2009	99%	89%	-	-
Galgano et al. <sup>15</sup>	2010	87%	83%	99%	74%
Wang et al. <sup>16</sup>	2004	81%	95%	100%	95%
Kong et al. <sup>17</sup>	2007	82%	100%	-	-
Guo et al. <sup>18</sup>	2011	79%	85%	90%	71%

La inmunotinción se ha aplicado también para el estudio de los frotis citológicos. En ellos tiene una doble función, por una parte permite localizar las células anormales y por otra permite una interpretación de sus características morfológicas (figura 47).

**Figura 47. Inmunotinción de los frotis citológicos con p16INK4a.**



Los resultados de un reciente estudio para seleccionar a mujeres con citologías ASCUS o LSIL para detectar CIN2+, comparando la inmunotinción p16 en el material residual de la citología líquida con el test HC2, han mostrado una sensibilidad para ASCUS de un 92,6% vs 90,1% y especificidad de 63,2% vs 37,8% ( $p<0,001$ ) y para LSIL una sensibilidad de 92,2% vs 95,7% y especificidad de 37,3% vs 18,5% ( $p<0,001$ ) respectivamente [98].

Estos resultados, concordantes con otros, han evidenciado una sensibilidad similar de p16 con los test de HPV, con un incremento significativo de la especificidad para detectar lesiones de alto grado subyacentes en el grupo de mujeres con resultados en la citología de ASCUS y LSIL.

#### **4.2.2.3. Tinción Dual p16/Ki67**

El conocimiento de la cadena de sucesos que tiene lugar durante el proceso de oncogénesis ha propiciado la constante búsqueda de marcadores moleculares. El objetivo es conseguir un marcador que posea una elevada sensibilidad y especificidad para detectar CIN2+, obviando todas esas numerosas anomalías en el cribado sin significación clínica para la prevención del cáncer, como las infecciones transitorias por HPV o las citologías ASCUS o LSIL, que en conjunto pueden llegar a representar hasta un 87% de todos los resultados citológicos anómalos del cribado con citología convencional en España [99].

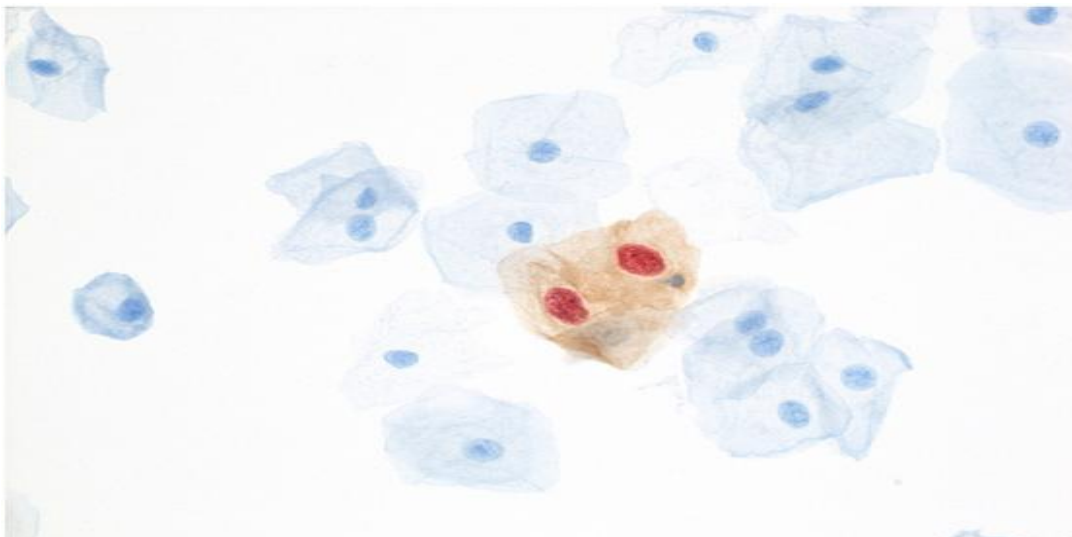
Uno de esos nuevos marcadores moleculares es la tinción dual p16/Ki67.

El test p16 original se basa en la interpretación de la morfología de las células teñidas por este marcador. Recientemente se ha desarrollado un nuevo marcador de tinción que no depende de la interpretación morfológica y parece capaz de reducir la subjetividad propia de la citología. Se basa en la combinación de dos marcadores en un solo test, la proteína antiproliferativa p16 y el marcador de proliferación Ki67.



La proteína Ki67 es un marcador celular estrictamente asociado a proliferación celular. Su presencia es constante en todas las fases del ciclo celular, aunque su presencia en G1 puede variar, y se degrada rápidamente cuando las células entran en estado de no-proliferación (fase G0). Por ello la **detección simultánea de p16 y Ki67** en una misma célula puede servir como **indicador de desregulación del ciclo celular**, lo cual ocurre durante la transformación oncogénica inducida por HPV-AR. Por el contrario, en las células normales la expresión simultánea de p16 y Ki67 se excluyen mutuamente (figura 48).

**Figura 48. Tinción dual p16/Ki67. Las células positivas para ambas tinciones muestran citoplasma marrón por sobreexpresión de p16 y núcleo rojo por la expresión de Ki67.**



El test proporciona un criterio objetivo, independiente de la morfología, para identificar a aquellas mujeres con más probabilidad de albergar una lesión de alto grado.

En un estudio de validación clínica para el cribado de CIN2+, la sensibilidad de la tinción dual comparada con la citología y el test de HPV (HC2) ha sido de 90,1% vs 66,4% vs 96,4% y la especificidad de 95,3% vs 95,4% vs 90,2% respectivamente.

El incremento de sensibilidad de la tinción dual es muy significativo en comparación con la citología ( $p < 0,0005$ ), con igual nivel de especificidad. En la selección de citologías ASCUS o LSIL la sensibilidad es comparable al test HPV, pero con una especificidad significativamente mejor, en todas las edades [100].

Estos resultados muestran su posible utilidad clínica basada en el significativo aumento de la sensibilidad en comparación con la citología, similar a la sensibilidad de los test HPV, pero con un aumento de la especificidad muy significativo. Esto podría reducir sustancialmente el número de colposcopias innecesarias, sin perder sensibilidad para CIN2+. Por otra parte, la tinción dual es independiente de la edad de la paciente o del tipo de HPV.

#### **4.2.2.4. Marcadores de Metilación. Epigenética.**

La identificación de vías alternativas de inactivación de ciertos genes mediante procesos de metilación del DNA ha supuesto un cambio radical en el enfoque del diagnóstico genético de muchos procesos tumorales. Anteriormente se creía que las mutaciones eran los únicos procesos que intervenían en la inactivación o hiperexpresión de ciertas regiones genéticas con resultados patológicos.

El DNA presenta regiones ricas en dinucleótidos CpG llamadas “islas CpG” (C-phosphate-G, citosina y guanina separadas por un fosfato), que son reconocidas por las enzimas DNA-metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del DNA metilan las citosinas de la nueva cadena sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de DNA.

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores:



- Hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica.
- Hipermetilación de genes individuales.
- Hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes supresores tumorales.

Los dos niveles de metilación pueden presentarse de forma individual o simultánea. En general la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes, y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis.

El análisis de la metilación de ciertos genes como PAX1 junto con la detección de HPV se ha demostrado que puede incrementar hasta un 20% la sensibilidad diagnóstica para detectar CIN2+ [101, 102], aunque otros autores, a falta de desarrollo de mayor número de estudios, en un análisis de 15 genes metilados, distintos a PAX1, no han confirmado su utilidad como marcador precoz [103].

Por tanto, y por analogía con lo que ocurre con otros tumores como los colorrectales, el descubrimiento de los puntos críticos de metilación podría ofrecernos un arma muy potente para el diagnóstico precoz.



# OBJETIVOS

Los objetivos contemplados en este estudio y a los que se pretende dar respuesta son los siguientes:

- Evaluar la **eficacia diagnóstica** del test que detecta RNA mensajero (mRNA) de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (HPV-AR) que codifica para las oncoproteínas E6 y E7 (**APTIMA**) como **método de screening** del cáncer de cérvix.
- **Comparar** la eficacia del test **mRNA E6/E7** (APTIMA) con la eficacia de las técnicas que detectan DNA de HPV-AR: **Hibridación** (HC2) y **PCR** (cobas 4800 HPV test y Linear Array HPV Genotyping Test).
- **Correlacionar** los resultados del test **APTIMA** con la técnica de tinción inmunohistoquímica **p16INK4a**.
- Estudiar la utilidad del test **APTIMA** en el **manejo** de las mujeres con citologías clasificadas como **ASCUS** o **L-SIL**.
- Comprobar si el **test mRNA E6/E7** tiene utilidad para **predecir lesión residual** tras el tratamiento de lesiones premalignas del cérvix.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio es de tipo **poblacional descriptivo retrospectivo**.

Se han incluido en el estudio 203 pacientes operadas en la Unidad de Patología Cervical del Servicio de Ginecología del Hospital Santa Cristina de Madrid, entre los meses de Enero a Noviembre de 2013. Estas mujeres fueron intervenidas por presentar una lesión intraepitelial cervical (CIN) o vaginal (VAIN) confirmada (o sospechada) por biopsia (conizaciones diagnóstico-terapéuticas).

Las pacientes fueron inicialmente remitidas a la unidad de Patología Cervical desde Atención Primaria o desde Atención Especializada (consulta de ginecología) por presentar una alteración en la citología, presentar un HPV positivo para alto riesgo oncogénico, o tener sintomatología sugerente de patología del cuello uterino (coitorragias, visualización de lesiones en cérvix durante la realización de una citología, etc).

A todas las pacientes se les realizó un estudio diagnóstico, que supuso en la mayoría de los casos la realización de dos test de DNA de HPV (Hibridación y PCR) y otro test de mRNA E6/E7 (APTIMA), un estudio colposcópico, una biopsia diagnóstica dirigida bajo control colposcópico, y un estudio histológico con tinción inmunohistoquímica p16/Ki67.

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de HPV fueron las siguientes:

- **Hibridación HC2**
- **PCR Cobas 4800**
- **PCR Linear Array**
- **Test mRNA E6/E7 APTIMA**

El tratamiento realizado en estas pacientes fue de varios tipos: Conización con asa de diatermia (LLETZ en Europa, Large Loop Excision of the Transformation Zone/LLEP en EEUU, Loop Electrical Excision Procedure),

asociando o no la realización de un Legrado Endocervical, Electrocoagulación de cérvix/vagina o Histerectomía.

En todas las pacientes a las que se les realizó una conización +/- un legrado endocervical o histerectomía se obtuvo material para estudio histológico.

A las pacientes intervenidas se les hizo un control a partir de los 3 meses de la cirugía, mediante un estudio citológico, una colposcopia, una biopsia en casos seleccionados, y un estudio de HPV de alto riesgo (DNA y mRNA E6/E7).

## **2. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LAS PACIENTES**

**Criterios de inclusión:** pacientes a las que se les ha realizado una intervención quirúrgica por presentar una lesión intraepitelial cervical (confirmada o sospechada) desde Enero 2013 a Noviembre de 2013 y tenían realizado un estudio diagnóstico previo que incluye la determinación del DNA del virus del papiloma humano (HPV) así como del RNA mensajero de HPV que codifica para las oncoproteínas E6 y E7.

**Criterios de exclusión:** pacientes a las que no se les ha realizado el estudio de mRNA previo al procedimiento quirúrgico.

## **3. VARIABLES ESTUDIADAS**

A continuación se describen las diferentes variables que han sido evaluadas en este estudio.

- **Edad:**

El cáncer de cérvix en Europa es globalmente el 4º cáncer más común en la mujer y séptima causa de mortalidad por cáncer en la

mujer. Pero en la mujer joven, de 18 a 45 años, el cáncer de cérvix representa el segundo cáncer más común y la segunda causa de mortalidad por cáncer [104].

Por otra parte, la prevalencia de HPV es mayor en mujeres jóvenes y tiende a disminuir con la edad, aunque se ha observado un segundo pico de infección en mujeres alrededor de la menopausia que puede ser debido a una reactivación de infecciones latentes o infecciones nuevas en el periodo perimenopáusico [105]. Además la edad a la que la mujer se infecta parece ser un fuerte factor predictor del pronóstico y de la evolución de la infección, de tal manera que cuanto más joven es la mujer a la edad de la primoinfección parece que peor pronóstico y evolución tendrá dicha infección [106].

- **Menarquia:**

El tiempo comprendido entre la menarquia y el inicio de las relaciones sexuales es conocido como un factor de riesgo para el desarrollo de lesiones preneoplásicas a nivel cervical, de modo que cuanto menor es el tiempo entre la menarquia y el inicio de relaciones mayor es el riesgo de desarrollar lesiones. Las adolescentes tienen un predominio de células metaplásicas y endocervicales sobre el ectocérvix, lo cual lo hace especialmente vulnerable al HPV y otros agentes de infección de transmisión sexual [107].

La edad de la menarquia se ha recogido de forma numérica.

- **Inicio de las relaciones sexuales:**

El comienzo de la relaciones por debajo de 20 años, y sobre todo por debajo de 18, hace que aumente la probabilidad de desarrollar lesiones precancerígenas o cáncer invasivo de cérvix [108].

Recogida de dato: numérica.

- **Estudios (nivel):**

Otro de los factores que clásicamente se han asociado al riesgo de CIN o cáncer de cérvix es el bajo nivel educativo [106].

Se ha clasificado a las pacientes en dos categorías: con estudios superiores y sin estudios superiores.

- **Uso de anticoncepción hormonal:**

Los mecanismos hormonales pueden influir en la evolución en la progresión de lesión premaligna a maligna, promoviendo la integración del DNA del virus en el genoma de la célula infectada, produciendo una desregulación de la expresión de E6 y E7 de aquellas líneas celulares infectadas [106].

El uso de anticonceptivos se ha recogido en función del tiempo de uso (> 5 años multiplica por 4 la probabilidad de desarrollar un cáncer de cérvix en las pacientes portadoras de HPV).

Las pacientes del estudio se han clasificado como no usuarias de anticonceptivos y usuarias.

- **Tabaco:**

El tabaquismo se asocia de forma consistente con el cáncer cervical. El riesgo varía hasta multiplicarse por tres en fumadoras habituales. En mujeres HPV positivas se encuentran más casos de CIN 3 en mujeres fumadoras que de CIN 1, sugiriendo que las células infectadas por HPV evolucionan a malignidad gracias a los carcinógenos presentes en el tabaco [109,110].

Según esta variable las pacientes eran no fumadoras o fumadoras (actualmente o previamente).

- **Antecedentes familiares de cáncer de cérvix:**

Junto a los cofactores medioambientales y aquellos relacionados con el estilo de vida, existen probablemente otros cofactores



relacionados con factores genéticos tanto virales como del huésped. Uno de los factores que se ha estudiado son los genes HLA (antígenos leucocitarios humanos) [111]. Existen estudios que afirman que un pequeño porcentaje de mujeres presentan una susceptibilidad familiar para desarrollar cáncer de cérvix y otras neoplasias relacionadas con el virus del papiloma humano [112].

Para esta variable las categorías eran: no antecedentes familiares o antecedentes familiares de primer grado con CIN/cáncer de cérvix.

- **Historial Adecuado de Cribado:**

En España, las neoplasias cervicales, intraepiteliales e invasoras siguen siendo un problema no resuelto, y provoca la muerte de 2 mujeres al día. El principal motivo es no haber realizado un cribado citológico adecuado, como ocurre en el 80% de las mujeres españolas que desarrollan un cáncer cervical [57].

Por ese motivo en el estudio queda reflejado si existe o no un historial adecuado de cribado.

- **Paridad:**

La alta paridad se asocia consistentemente con el cáncer cervical y el cáncer in situ [106].

Se ha clasificado a las pacientes como nulíparas, primíparas (único parto) o multíparas (dos o más partos).

- **Citología:**

La citología ha conseguido disminuir la morbi-mortalidad del cáncer de cérvix en un 70.80% en las poblaciones en las que se ha logrado implantar [51-53]. La citología se realizó con doble toma exocervical y endocervical y se procesó según la técnica de Papanicolau convencional.

Los hallazgos citológicos se han clasificado siguiendo los criterios de terminología de la clasificación de Bethesda [113].

Los hallazgos citológicos han sido agrupados posteriormente en tres categorías: **negativa para malignidad, lesiones intraepiteliales de bajo grado y lesiones intraepiteliales de alto grado.**

- **Colposcopia:**

El objetivo general de la colposcopia es el diagnóstico y la orientación terapéutica de las lesiones premalignas y malignas cervicales y vaginales. Las imágenes observadas con el colposcopio permiten identificar características de los epitelios que son expresión, y por tanto tienen una alta correlación, de cambios patológicos más o menos graves. La biopsia dirigida de esas imágenes es la que nos permite hacer el diagnóstico de neoplasia intraepitelial o cáncer de cérvix/vagina.

Los hallazgos colposcópicos se han clasificado siguiendo la Nomenclatura IFCPC (International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy) aceptada en el Congreso Mundial de Río de Janeiro en Julio de 2011.

- **Biopsia:**

El estudio histológico se sigue considerando el gold standard para el diagnóstico de lesiones intraepiteliales cervicales (CIN).

Los posibles hallazgos encontrados en el estudio anatomopatológico han sido agrupados en 3 categorías: **negativo para malignidad, lesiones <CIN 2, lesiones ≥CIN 2 (CIN 2+).**

El “end point” o variable principal del estudio es el diagnóstico de lesiones de alto grado **CIN 2+**, y **CIN 3+**.

- **Tinción Inmunohistoquímica con p16INK4a**

La determinación de p16 nos informa de la interacción del HPV con las proteínas reguladoras del ciclo celular y constituye un buen candidato a marcador de proliferación neoplásica. Tenemos evidencias, proporcionadas por estos estudios, de que la tinción inmunohistoquímica para p16 reduce el número de diagnósticos

falsamente negativos, mejorando de forma significativa el diagnóstico de lesiones premalignas del cérvix uterino [97].

Para el estudio se han considerado dos categorías: negativo (incluyendo positivos focales o dudosos) y positivo.

- **HPV-DNA:**

La infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo es causa necesaria para el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del cérvix [5-18].

Existen diversos test que detectan la presencia de DNA de HPV de alto riesgo, cuyo objetivo es determinar las pacientes infectadas por el virus y por tanto con riesgo de desarrollar enfermedad.

La recogida de muestras para el estudio de DNA, tanto para hibridación como para PCR, se realizó mediante un cepillo específico que se introduce en el canal endocervical. Las muestras se conservaron en el medio **cobas® PCR Cell Collection Media** (Roche).

**Hibridación:**

Una de las técnicas que se han utilizado para la determinación del DNA del HPV es la técnica de **Captura Híbrida 2 (HC2)**, que utiliza una sonda RNA que detecta la presencia de 13 tipos diferentes de HPV de alto riesgo oncogénico: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (**Digene HC2 High-Risk HPV DNA Test**).

La HC2 es una técnica basada en la amplificación de la señal del híbrido RNA-DNA. Las muestras que contienen el DNA diana hibridan con un RNA específico de algunos tipos de HPV de alto riesgo incluidos en la sonda. Los híbridos resultantes DNA-RNA son capturados en la superficie de una microplaca con un anticuerpo específico antihíbrido DNA/RNA. Los híbridos inmovilizados reaccionan entonces con un anticuerpo específico conjugado con fosfatasa alcalina y son detectados con un sustrato quimioluminiscente. Múltiples anticuerpos conjugados se unen a

cada híbrido capturado, resultando una amplificación significativa de la señal. La intensidad de la luz emitida detecta la presencia o ausencia del DNA diana en la muestra.

Se ha utilizado un ratio de 1 unidad relativa de luz como límite para positividad, un cut-off recomendado para la práctica clínica por su buen balance sensibilidad/especificidad [114].

El resultado de la Hibridación se muestra como negativo o positivo.

### **PCR Cobas 4800**

El **cobas® 4800 Human Papillomavirus (HPV) Test** es un test in vitro de tipo cualitativo que permite identificar la presencia de 14 tipos de HPV de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68.

Se trata de una técnica de amplificación de secuencias de DNA diana mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una hibridación de ácidos nucleicos.

El test permite identificar específicamente los tipos 16 y 18 de modo individual (positivo o negativo para cada uno de los dos), y el resto de tipos de forma agrupada (positivo o negativo para cualquiera de ellos).

En el estudio se muestra el resultado de esta técnica como positivo o negativo.

### **PCR Linear Array:**

Para tipificar las muestras positivas obtenidas tras realizar la técnica de hibridación o tras la técnica cobas 4800 (cuando ésta nos indica un resultado positivo distinto de HPV 16 ó HPV 18) se utilizó el **Linear Array HPV Genotyping Test (Roche CE-IVD Test Kit for HPV GenotypingW)**, una prueba cualitativa que detecta 37 genotipos de VPH, tanto de bajo como de alto riesgo oncogénico: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 y CP6108.

Utiliza la amplificación del DNA diana mediante la técnica de **reacción en cadena de la polimerasa** y la hibridación posterior del ácido nucleico obtenido, con sondas específicas fijadas sobre una tira de nitrocelulosa que tiene una lectura colorimétrica.

Utiliza un pool de “primers consensus” para la amplificación y un control de b-globina como control del DNA celular.

El límite de detección de la técnica es muy amplio y se mueve en rangos de 120 copias/ml para el tipo 16 y de 300.000 copias/ml para el tipo 64. Para la mayoría de los genotipos, está en torno a las 900 copias/ml. Es, además, una técnica capaz de detectar coinfecciones.

Recogida: categórica, globalmente (negativo o positivo si se detecta uno o más tipos virales) y para cada uno de los valores.

- **HPV-mRNA E6/E7**

Los test que detectan RNA mensajero que codifica para las oncoproteínas E6 y E7 de los virus HPV de alto riesgo tiene como objetivo seleccionar a aquellas pacientes con mayor riesgo de desarrollar enfermedad o de progresión de la misma.

Diversos estudios han evaluado la efectividad diagnóstica de estos test como método primario de cribado (sólo o en combinación con la citología), triaje de mujeres con resultados positivos en la prueba de DNA y triaje de mujeres con citologías anormales [6].

El test utilizado en este estudio se denomina **APTIMA® HPV Assay-Targeting E6/E7 mRNA (HOLOGIC GEN-PROBE)**.

Este test realiza una amplificación in vitro de ácidos nucleicos para detectar RNA mensajero (mRNA) viral que codifica para las oncoproteínas E6 y E7 de 14 tipos de HPV de alto riesgo oncogénico. Se trata por tanto de un test cualitativo, que detecta mRNA de los tipos: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68, sin poder discriminar entre los mismos. Las muestras utilizadas fueron las mismas que se usaron para el estudio de DNA (conservadas a 4°C en medio cobas® PCR Cell Collection Media).

Este método presenta tres principales pasos: **captura del mRNA** diana, **amplificación de la diana** mediante TMA (amplificación mediante transcripción), y la **detección de los productos de amplificación** por el HPA (procedimiento de protección e hibridación). El procedimiento incorpora un control interno para monitorizar la captura, amplificación y detección del ácido nucleico, así como el error instrumental o del operador.

Las muestras se transfieren a un tubo que contiene STM, medio de transporte específico, que lisa la célula, libera el mRNA y lo protege de la degradación durante el almacenamiento. Durante el procesamiento de la muestra, el mRNA diana es aislado mediante el uso de oligómeros de captura que están ligados a micropartículas magnéticas. Los oligómeros de captura contienen secuencias complementarias a regiones específicas al mRNA objetivo, así como una cadena de residuos de deoxiadenosina. Durante la hibridación las regiones de secuencia específicas de los oligómeros de captura se unen a regiones específicas del mRNA HPV. El complejo oligómero-mRNA diana es entonces extraído de la solución mediante la disminución de la temperatura, lo que permite el proceso de hibridación entre la región desoxiadenosina del oligómero de captura y moléculas deoxitimidina que están unidas a partículas magnéticas. Las micropartículas, incluidas las moléculas de mRNA diana unidas a ellas, son aisladas del resto de la solución y posteriormente lavadas para eliminar residuos.

Posteriormente tiene lugar la amplificación del mRNA mediante TMA, que es un método de amplificación basada en la transcripción de ácidos nucleicos, y que utiliza dos enzimas; MMLV transcriptasa reversa y T7 RNA polimerasa. La transcriptasa reversa generará una copia de DNA del mRNA diana que contiene secuencias promotoras para la T7 RNA polimerasa, la cual producirá múltiples copias del RNA amplificado a partir del DNA.

La detección de los productos de amplificación se realiza mediante sondas quimioluminiscentes que son complementarias a los productos de amplificación y que serán detectadas gracias a la

emisión lumínica. Los resultados finales son interpretados según el análisis de la señal de corte.

El valor de esta variable aparece como negativo o positivo, sin discriminar entre los diferentes tipos virales.

- **Tratamiento realizado**

Los posibles tratamientos realizados se encuadran dentro de una de las siguientes opciones: Conización con o sin legrado endocervical, Electrocoagulación o Histerectomía.

- **Resultados anatomopatológicos de la pieza(s) quirúrgica**

En todas las pacientes sometidas a conización +/- legrado endocervical se realizó un estudio anatomopatológico. No así en aquellas mujeres que fueron tratadas mediante electrocoagulación de las lesiones cervicales (o vaginales).

Los hallazgos anatomopatológicos de la conización/legrado endocervical se han clasificado con idénticos criterios a los hallazgos de la biopsia.

Igualmente se ha procedido en los casos en los que se realizó una reconización.

Se incluyó, como dato importante para el pronóstico de la enfermedad, el estado de los bordes de la pieza quirúrgica (libres o afectados).

- **Revisión post-tratamiento:**

A la mayoría de las pacientes a las que se les realizó un tratamiento por una lesión intraepitelial cervical se les hizo posteriormente una revisión en la Unidad de Patología Cervical. Esta revisión tuvo lugar a partir de 3 meses tras la cirugía.

- **Datos post-tratamiento:**

En los casos en los que se llevó a cabo el control tras el tratamiento se realizó:

Citología, colposcopia, HPV DNA (hibridación, PCR cobas 4800 y en algunos casos PCR Linear Array para tipificar), HPV mRNA E6/E7 y biopsia con inmunohistoquímica p16 (sólo en determinados casos). Para todos estos parámetros se han utilizado las mismas categorías que para los datos previos al tratamiento.

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha realizado un análisis descriptivo tomando **medidas de tendencia central (media) y de dispersión** (desviación típica y/o máximo y mínimo) para aquellas variables cuantitativas. Proporciones y frecuencias o intervalos de confianza al 95% se muestran para variables cualitativas.

Para la comparación de proporciones se realizó el **test chi-cuadrado** o el **test de exacto de Fisher** donde era necesario.

Para analizar el grado de acuerdo entre las diferentes técnicas diagnósticas se ha estimado el **índice Kappa** y su respectivo intervalo de confianza al 95%.

Para analizar la utilidad de las nuevas técnicas diagnósticas frente a técnica diagnóstica actual, la anatomía patológica o histología (gold standard), se ha estimado **sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e intervalo de confianza al 95%** para todas ellas.

Se consideran valores **estadísticamente significativos  $p \leq 0.05$** . El análisis estadístico se ha realizado con **Stata v.13**.



# RESULTADOS

## 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Para este estudio se incluyeron un total de 203 mujeres, que fueron intervenidas en la Unidad de Patología cervical entre los meses de Enero de 2013 y Noviembre de 2013.

La **edad** media de las pacientes fue de 35 años, con un mínimo de 19 años y un máximo de 66.

La media de la **menarquia** en estas mujeres fue de 12,67 años (8-17 años como extremos).

El promedio de edad de **inicio de relaciones sexuales** en nuestra muestra fue de 18,85 años (13-35).

El 43,48% de las mujeres han cursado **estudios** superiores frente al 56,52 % de mujeres que no lo han hecho. Un 9,35% de la muestra no ha proporcionado datos al respecto.

Las pacientes no usuarias de **anticoncepción hormonal** suponen el 67% del total, siendo un 33% las usuarias.

Menos de la mitad de las mujeres eran **fumadoras** (33%). Un 67 % de las mujeres afirman no ser fumadoras.

El 7,38% de las mujeres tiene algún **antecedente en familiares** de primer grado de neoplasia intraepitelial o cáncer de cérvix. La mayoría (92,61%) no presentaba antecedentes familiares.

La proporción de mujeres que se habían realizado previamente controles periódicos como **screening del cáncer de cérvix** es similar a la de las mujeres que no se habían realizado controles adecuados; un 57,92% frente a un 42% (en uno de los casos no consta el antecedente de realización de screening).

Si estratificamos según **paridad** encontramos que más de la mitad de las mujeres eran nulíparas en el momento del estudio (62,56%). Un 14,28% han tenido un solo parto y un 23,15% dos o más partos.

En las siguientes tablas (Figuras 49 y 50) se resumen los datos reflejados previamente.

**Figura 49. Variables cuantitativas**

Variable	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Edad	35,07	9,24	19	66
Menarquia	12,67	1,59	8	17
Inicio relaciones sexuales	18,85	3,25	13	35

**Figura 50. Variables cualitativas**

Variable	Categoría	Porcentaje	Intervalo confianza 95%
Estudios	Superiores	43,48	[36,43-50,80]
	No superiores	56,52	[45,02-64,23]
Uso de anticoncepción hormonal	No	66,99	[60,18-73,16]
	Si	33,00	[26,83-39,82]
Tabaco	No	66,99	[60,18-73,16]
	Si	33,00	[26,83-39,82]
Antecedentes familiares	No	92,61	[88,06-95,51]
	Si	7,38	[4,48-11,94]

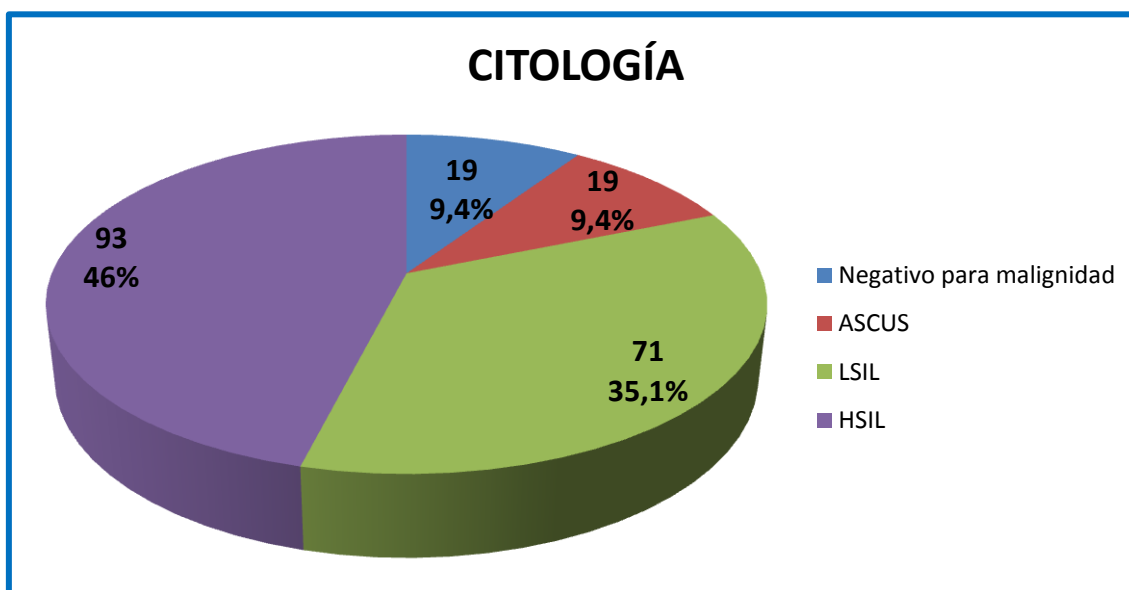
Variable	Categoría	Porcentaje	Intervalo confianza 95%
Historial adecuado de screening	Si	57,92	[50,94-64,59]
	No	42,08	[35,40-49,05]
Paridad	Nulípara	62,56	[55,64-69,00]
	Primípara	14,28	[10,08-18,86]
	Multípara	23,15	[17,82-29,51]

## 2. DISTRIBUCIÓN DE LAS LESIONES

### Citología

De las 203 mujeres incluidas en el estudio 19 (9,4%, IC 95% [5,1-13,7]) tenían una citología **negativa para malignidad**, otras 19 (9,4% IC [5,1-13,7]) una citología **ASCUS**, 71 (35,1%, IC [28,3-42]) tenían un **LSIL** y 93 (46%, IC [38,9-53,2]) un **HSIL**. En uno de los casos no se realizó citología al inicio del estudio. En la figura 51 se muestra un gráfico con los resultados.

Figura 51. Hallazgos citológicos



Para realizar las comparaciones pertinentes los hallazgos citológicos se han clasificado en tres categorías:

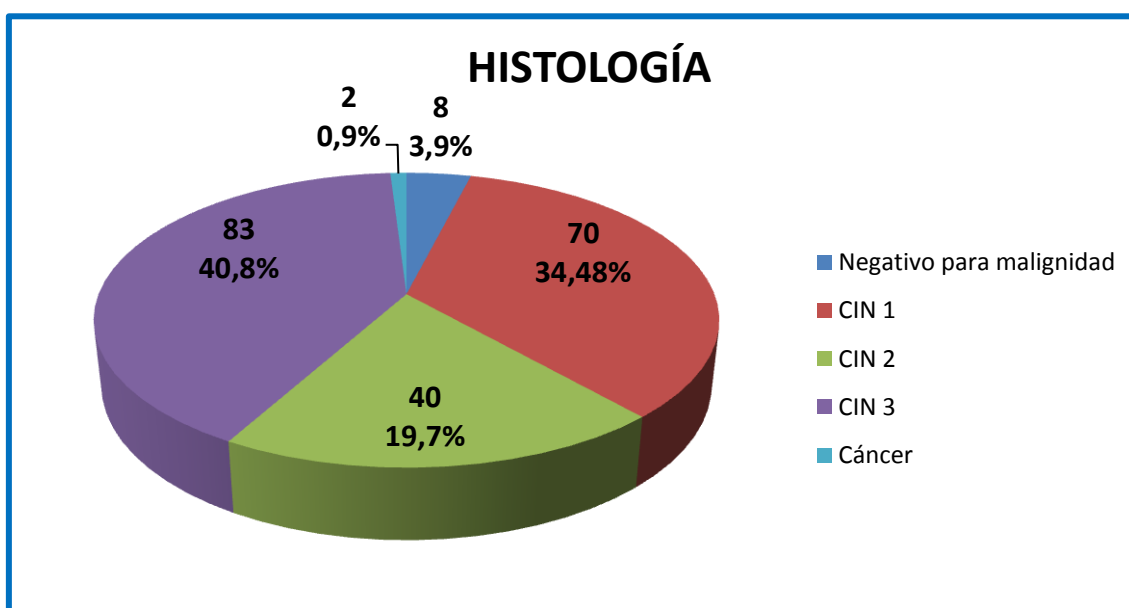
- **Negativo para malignidad:** 19 pacientes (**9,41%** del total).
- **Lesiones de bajo grado** (incluyen ASCUS, LSIL, citología sugestiva de infección por HPV, AGUS, VAIN I): 90 pacientes (**44,55%**).
- **Lesiones de alto grado** (ASC-H, HSIL, CIS, VAIN II y III, sugestiva de carcinoma/adenocarcinoma ): 93 pacientes (**46,04%**).

### Histología

A continuación se muestra la distribución de las lesiones según diagnóstico histológico, tomando como referencia el mayor grado histológico encontrado en biopsia o en estudio de pieza quirúrgica tras realizar una conización.

En 8 pacientes (0,9%, IC [1,0-6,9]) no se encontró lesión en el estudio histológico. En 70 (34,48%, IC [27,7-41,3]) el resultado fue de **CIN 1**, en 40 (19,7%, IC [14-25,4]) un **CIN 2**, y en 83 (40,8%, IC [33,9-47,9]) un **CIN 3**. Sólo dos pacientes (0,9%, IC [0,1-3,5]) presentaron un cáncer de cérvix. En la Figura 52 se muestra el gráfico correspondiente.

**Figura 52. Hallazgos Histológicos (peor resultado histológico)**



La distribución de los hallazgos histológicos para el análisis estadístico se ha realizado como se refleja a continuación:

- **Negativo para malignidad** (sin evidencia de lesión, metaplasias, atipias): 8 pacientes (**3,94%** del total).
- **Lesiones < CIN 2** o lesiones de bajo grado (alteraciones sugestivas de HPV, CIN I, VAIN I): 70 pacientes (**34,48%**).
- **Lesiones  $\geq$  CIN 2** o también denominadas CIN 2 +, lesiones de alto grado (CIN II y III, CIS, carcinoma/adenocarcinoma infiltrante, VAIN II y III): 125 pacientes (**61,58%**).
- **Lesiones  $\geq$  CIN 3** o CIN 3 + (mismo grupo de pacientes que el anterior excluyendo aquellas mujeres con diagnóstico de CIN 2): 85 pacientes (**41,87%**).

Para este estudio el objetivo final o “**end point**” utilizado es la detección de CIN 2+, es decir, de lesiones de alto grado diagnosticadas mediante histología.

Sin embargo, también se han obtenido datos utilizando como “end point” CIN 3+, es decir, excluyendo las lesiones denominadas CIN 2 (neoplasias intraepiteliales cervicales de grado 2 o “moderado”). En las últimas décadas se ha reconocido como “end point” más fiable el CIN 3+. Ello es debido a que parte de las lesiones CIN 2 son transitorias, y por tanto susceptibles de regresar espontáneamente, y por otra parte se trata de un diagnóstico histológico con una pobre reproducibilidad, a nivel interobservador o incluso intraobservador [115].

### **3. DISTRIBUCIÓN DE LOS TIPOS VIRALES**

La distribución de los tipos virales encontrados en nuestro grupo de pacientes, independientemente del tipo de lesión, es el que se muestra en la siguiente tabla (figura 53).

Se recogen tanto los HPV de alto riesgo como los de bajo riesgo.

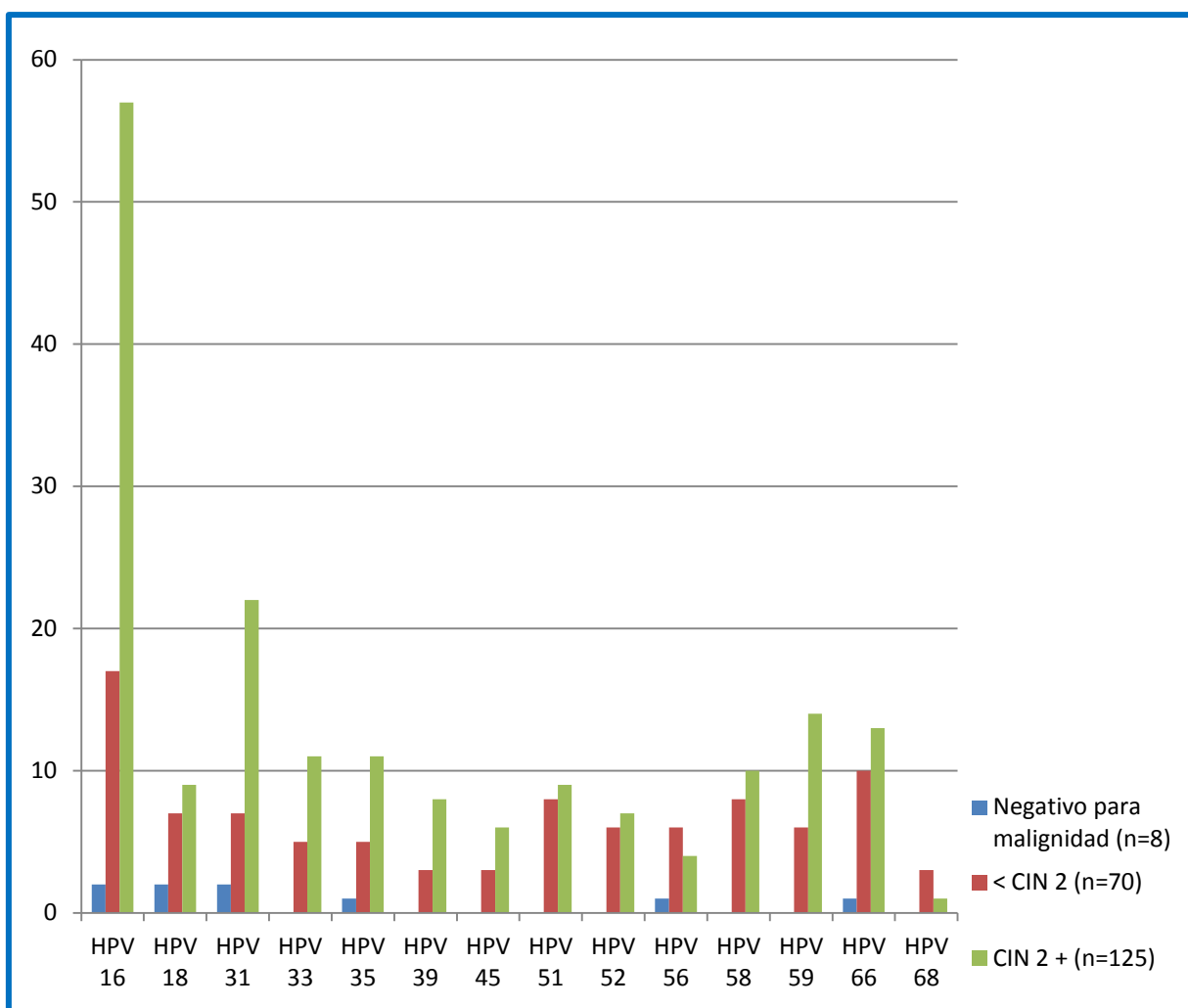
**Figura 53. Distribución de los tipos de HPV de alto y bajo riesgo**

<b>HPV 6:</b> 10 casos (4,92%)	<b>HPV 59:</b> 20 casos (9,85%)
<b>HPV 11:</b> 1 caso (0,49%)	<b>HPV 61:</b> 11 casos (5,42%)
<b>HPV 16:</b> 76 casos (37,44%)	<b>HPV 62:</b> 15 casos (7,39%)
<b>HPV 18:</b> 18 casos (8,86%)	<b>HPV 64:</b> 0 casos (0%)
<b>HPV 26:</b> 2 casos (0,98%)	<b>HPV 66:</b> 24 casos (11,82%)
<b>HPV 31:</b> 31 casos (15,27%)	<b>HPV 67:</b> 7 casos (3,45%)
<b>HPV 33:</b> 16 casos (7,88%)	<b>HPV 68:</b> 4 casos (1,97%)
<b>HPV 35:</b> 17 casos (8,37%)	<b>HPV 69:</b> 0 casos (0%)
<b>HPV 39:</b> 11 casos (5,42%)	<b>HPV 70:</b> 2 casos (0,98%)
<b>HPV 40:</b> 2 casos (0,98%)	<b>HPV 71:</b> 3 casos (1,48%)
<b>HPV 42:</b> 17 casos (8,37%)	<b>HPV 72:</b> 0 casos (0%)
<b>HPV 45:</b> 9 casos (4,43%)	<b>HPV 73:</b> 19 casos (9,36%)
<b>HPV 51:</b> 17 casos (8,37%)	<b>HPV 81:</b> 5 casos (2,46%)
<b>HPV 52:</b> 13 casos (6,40%)	<b>HPV 82:</b> 6 casos (2,95%)
<b>HPV 53:</b> 18 casos (8,86%)	<b>HPV 83:</b> 8 casos (3,94%)
<b>HPV 54:</b> 7 casos (3,45%)	<b>HPV 84:</b> 17 casos (8,37%)
<b>HPV 55:</b> 5 casos (2,46%)	<b>HPV IS39:</b> 0 casos (0%)
<b>HPV 56:</b> 11 casos (5,42%)	<b>HPV CP6108:</b> 10 casos (4,92%)
<b>HPV 58:</b> 18 casos (8,86%)	

Considerando sólo los HPV de alto riesgo vemos que el **tipo más frecuente es el 16, seguido del 31**. Los tipos **66 y 59** son los siguientes en frecuencia. Los tipos **73, 18, 58, 35, 51 y 33** se encuentran en un porcentaje similar. Les siguen en frecuencia **52, 39, 56, 45, 67, 82 y 68**.

Si atendemos a la histología de las lesiones la distribución de los principales tipos de HPV de alto riesgo sería como se refleja en la Figura 54 (en este caso sólo se incluyen los tipos de HPV de alto riesgo que es capaz de detectar el test APTIMA).

**Figura 54. Distribución de los tipos de HPV de alto riesgo según histología**



Igualmente encontramos que los tipos **16 y 31 son los más frecuentes** si tenemos en cuenta la **histología**.

El 45,6% de las pacientes con CIN2 + (n=125) tenían una infección por HPV 16, y un 17,6% de este mismo grupo de pacientes por el tipo 31.

#### 4. RESULTADOS DE LOS TEST DE DETECCIÓN DE HPV Y TINCIÓN p16INK4a

De las 203 pacientes estudiadas, previamente a la cirugía, 185 (**91,13%**) tuvieron un test positivo para la técnica de DNA de captura de híbridos **HC2**, y 186 (**91,63%**) para la técnica de DNA **cobas 4800**.

La técnica de DNA **Linear Array** detectó al menos un tipo de virus en 192 (**94,58%**) mujeres, de los cuales sólo en 10 casos (5,20%) correspondieron a tipos virales que no son estudiados por el test APTIMA (6,42, 53, 62, 67, 73, 81 en dos casos, 83 y 84). Una paciente con el tipo 67 y uno de las que presentó el tipo 81 tuvieron el test APTIMA positivo, a pesar de tratarse de tipos virales no detectados por APTIMA.

En cuanto a la tinción inmunohistoquímica **p16INK4a**, en 33 pacientes (16,9%) la tinción fue negativa, en 7 (3,6%) fue focal o dudosa, y en 155(**79,48%**) fue **positiva difusa**. En 8 pacientes no se realizó esta tinción previa a la cirugía.

166 pacientes mostraron un resultado positivo para el test APTIMA, lo que supone el **81,8%**. El 18,2% restante de las pacientes fueron negativas para APTIMA en el test realizado en las muestras prequirúrgicas.

#### 5. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS PREVIAS AL TRATAMIENTO

A continuación se muestra la comparación entre las diferentes técnicas de diagnóstico empleadas en este estudio. Se han comparado los datos obtenidos previamente al procedimiento quirúrgico. Posteriormente se analizarán los datos postquirúrgicos.

##### **Comparación entre el test APTIMA y el test Captura de Híbridos HC2**

El total de las 203 pacientes fueron estudiadas con ambos test.

Como ya se ha comentado el 81,77% del total fueron positivas para el test APTIMA y el 91,13% para el test HC2 (independientemente del resultado histológico).



El 89,19% de las pacientes con test HC2 positivo también lo fueron para APTIMA, y el 94,4% de las pacientes con test HC2 negativo también lo fue para APTIMA.

Sólo un 10.81% de las pacientes con HC2 positivo fueron negativas para APTIMA. Y únicamente una paciente con APTIMA positivo tuvo un resultado negativo para Hibridación (5,56%).

La relación entre ambos test resultó ser **estadísticamente significativa** con una  $p < 0,0001$ .

El índice de **Kappa** (concordancia entre dos observadores) fue de 0,56 con un intervalo de confianza del 95% [0,41-0,73], es decir, la fuerza de concordancia fue **moderada**.

#### **Comparación entre el test APTIMA y el test cobas 4800**

El test de cobas resultó ser positivo en el 91,63% de las pacientes, frente al 81,77% que fueron positivas para APTIMA.

El 88,71% de las muestras con test cobas 4800 positivo resultó ser también positivo para APTIMA. El 94,12% de mujeres con cobas 4800 negativo, fue también negativo para APTIMA.

Al igual que con el test HC2 sólo un resultado positivo para APTIMA fue negativo para el test Cobas 4800.

La relación entre el test APTIMA y el test cobas 4800 fue **estadísticamente significativa** ( $p < 0,0001$ ).

El índice de **Kappa** mostró una concordancia **moderada** (0,54 IC [0,38-0,70]).

### **Comparación entre el test APTIMA y Linear Array**

Las pacientes de este estudio tuvieron un resultado positivo para el test de Linear Array en el 94,58%, incluyendo los 37 tipos de HPV que detecta este test.

El 100% de las pacientes en las que el test Linear Array fue negativo lo fue también para APTIMA.

El 86,46% de las muestras positivas para Linear Array tuvieron un resultado positivo para APTIMA.

Si solamente consideramos positivos los casos en los que el test Linear Array es positivo sólo para alguno de los tipos que incluye asimismo el test APTIMA el porcentaje de positividad de Linear Array baja al 89,66% de las pacientes. Y el porcentaje de mujeres con test positivo Linear Array que obtuvo resultado positivo con APTIMA fue del 90,11%.

En dos pacientes (9,52%) se detectó con Linear Array un tipo viral diferente a los tipos que detecta APTIMA y sin embargo el test APTIMA tuvo un resultado positivo.

La relación entre APTIMA y Linear Array fue **estadísticamente significativa** considerando los 37 tipos virales o sólo los 14 que detectan en común ambos test ( $p < 0,0001$ ).

El índice de concordancia **Kappa** fue de 0,41 (IC [0,24-0,58]), es decir, **moderado** como en los casos anteriores si consideramos los 37 tipos virales que detecta el test Linear Array.

Si sólo consideramos los 14 tipos virales comunes a los dos test, la concordancia entre ambos mejora, y se sitúa en 0,60 (IC [0,45-0,76]), lo que supone una fuerza de concordancia **moderada-buena**.

### **Comparación entre el test APTIMA y la tinción inmunohistoquímica p16INK4a**

Para realizar esta comparación se ha considerado como tinción p16INK4a (p16) positiva aquellos casos en los que la positividad es “difusa”. Por el contrario se han considerado como negativos los casos de p16 positiva focal o positiva dudosa.

El 79,49% de la muestra del estudio ha resultado positiva para la tinción p16, independientemente del grado histológico de la lesión tratada.

El 90,97% de las pacientes con tinción p16 positiva también presentaron un test APTIMA positivo.

Sin embargo en las muestras con p16 negativa la mitad tenían APTIMA positivo y la otra mitad APTIMA negativo.

Hubo asociación **estadísticamente significativa** entre las dos variables ( $p < 0,0001$ ).

Igualmente se ha calculado el índice de concordancia **Kappa** entre el test APTIMA y la tinción p16, obteniéndose un resultado de 0,43 (IC [0,27-0,59], que vuelve a ser una concordancia **moderada**.

El mejor índice Kappa lo encontramos al comparar el test APTIMA y el test Linear Array cuando este último es positivo para alguno de los 14 tipos virales que detecta APTIMA.

A continuación se muestran en una tabla todos los datos previamente comentados sobre las comparaciones realizadas entre los distintos test APTIMA y HC2, cobas 4800, Linear Array y tinción inmunohistoquímica p16INK4a.

**Figura 55. Relaciones entre test APTIMA y los test HC2, cobas 4800, Linear Array y tinción p16INK4a (previo cirugía)**

Test	Resultado	APTIMA + % (n)	APTIMA – % (n)	p
HC2	Positivo	89,19 (165)	10,81 (20)	<0,0001
	Negativo	5,56 (1)	94,44 (17)	
Cobas 48	Positivo	88,71 (165)	11,29 (21)	<0,0001
	Negativo	5,88 (1)	94,12 (16)	
Linear Array	Positivo	86,46 (166)	13,54 (26)	<0,0001
	Negativo	0,00 (0)	100 (11)	
Linear Array (14 tipos HPV)	Positivo	90,11 (164)	9,89 (18)	<0,0001
	Negativo	9,52 (2)	90,48 (19)	
p16INK4a	Positivo	90,97 (141)	9,03 (14)	<0,0001
	Negativo	50,0 (20)	50,0 (20)	

### **Positivización de APTIMA para los principales tipos virales de alto riesgo**

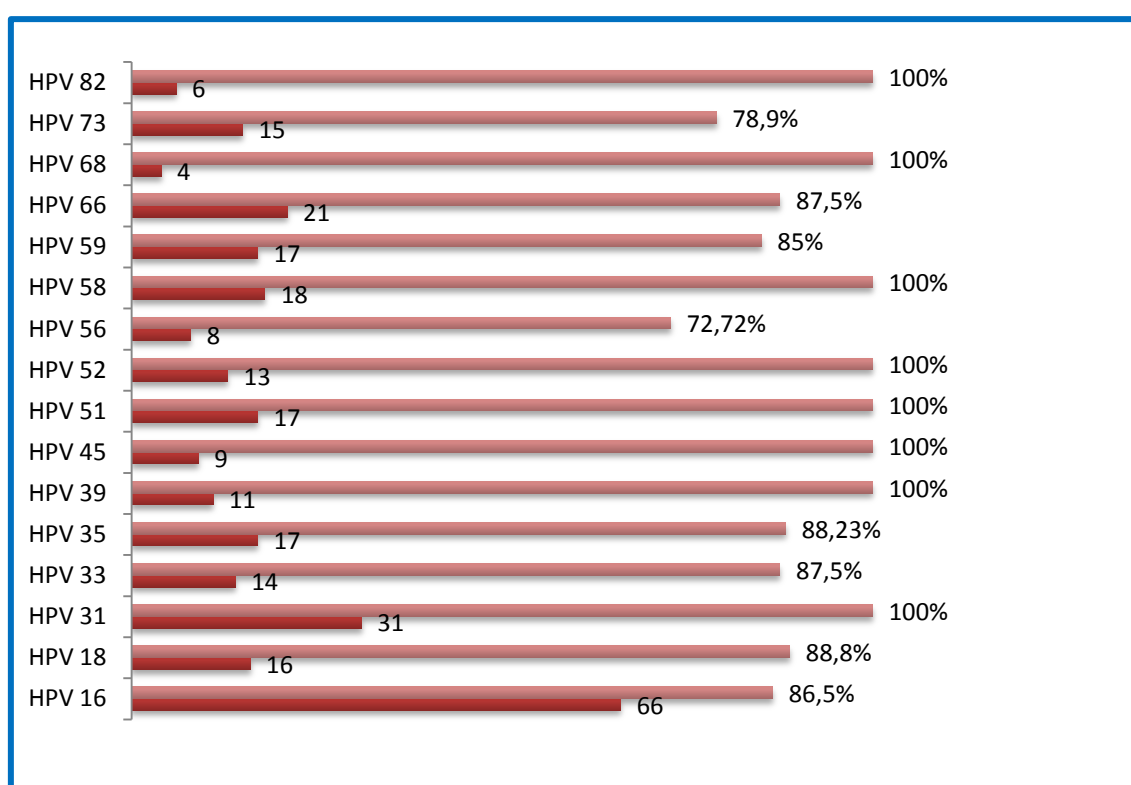
Uno de los estudios realizados ha sido comparar APTIMA con el test Linear Array para cada uno de los tipos virales detectados por Linear Array, con el objetivo de determinar si algunos tipos virales tienden a positivizar en mayor medida el test APTIMA, y por tanto tendrían un mayor riesgo oncogénico.

En la figura 56 se representa el número (y porcentaje) de infecciones de los principales tipos de HPV de alto riesgo que presentaron el test de APTIMA positivo.

Hay que tener en cuenta que un porcentaje muy elevado de las pacientes presentan infecciones por más de un tipo viral, por lo que en caso de infecciones múltiples con APTIMA positivo no podemos discernir cuál o cuáles de los tipos virales serían responsables de la positivización del test.

En nuestra casuística 70 pacientes (34,5%) de las 203 presentaban infección por un solo tipo de HPV.

**Figura 56. Número y porcentaje de infecciones con test APTIMA positivo**



Veamos en una tabla las relaciones entre APTIMA y los principales tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo detectados por Linear Array (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82).

**Figura 57. Comparación entre APTIMA y los principales tipos virales**

Test	Resultado	APTIMA + % (n)	APTIMA – % (n)	p
HPV16	Positivo	86,84 (66)	13,16 (10)	0,148
	Negativo	78,74 (100)	21,26 (27)	
HPV18	Positivo	88,89 (16)	11,11 (2)	0,537
	Negativo	81,08 (150)	18,92 (35)	
HPV 31	Positivo	100 (31)	0,00 (0)	0,002
	Negativo	78,49 (135)	21,51 (37)	
HPV 33	Positivo	87,50 (14)	12,50 (2)	0,742
	Negativo	81,28 (152)	18,72 (35)	
HPV35	Positivo	88,24 (15)	11,76 (2)	0,743
	Negativo	81,18 (151)	18,82 (35)	
HPV 39	Positivo	100 (11)	0,00 (0)	0,221
	Negativo	80,73 (155)	19,27 (37)	
HPV45	Positivo	100 (9)	0,00 (0)	0,370
	Negativo	80,93 (157)	19,07 (37)	
HPV51	Positivo	100 (17)	0,00 (0)	0,046
	Negativo	80,11 (149)	19,89 (37)	
HPV 52	Positivo	100 (13)	0,00 (0)	0,132
	Negativo	80,53 (153)	19,47 (37)	
HPV 56	Positivo	72,73 (8)	27,27 (3)	0,425
	Negativo	82,29 (158)	17,71 (34)	
HPV 58	Positivo	100 (18)	0,00 (0)	0,048
	Negativo	80,00 (148)	20,00 (37)	
HPV 59	Positivo	85,00 (17)	15,00 (3)	1,000
	Negativo	81,42 (149)	18,58 (34)	
HPV 66	Positivo	87,50 (21)	12,50 (3)	0,579
	Negativo	81,01 (145)	18,99 (34)	
HPV 68	Positivo	100 (4)	0,00 (0)	1,000
	Negativo	81,41 (162)	18,59 (37)	
HPV 73	Positivo	78,95 (15)	21,05 (4)	0,756
	Negativo	82,07 (151)	17,93 (33)	
HPV 82	Positivo	100 (6)	0,00 (0)	0,595
	Negativo	81,22 (160)	18,78 (37)	

Si atendemos a los resultados de tipado viral del test Linear Array dos pacientes presentaron infección por tipos virales diferentes a los detectados por el test APTIMA y sin embargo presentaron un resultado positivo para APTIMA. Una de ellas presentó una infección conjunta por virus tipo 62 y 81, y la otra por virus 67.

El riesgo oncogénico del tipo 62 se desconoce en el momento actual, el tipo 81 se ha clasificado como un virus de bajo riesgo y el 67 de riesgo intermedio-probablemente alto.

## 6. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS E HISTOLOGÍA DE LAS LESIONES

Para analizar la utilidad de las diferentes técnicas diagnósticas estudiadas es necesario atender a los hallazgos histológicos.

La anatomía patológica o histología de la lesión ha sido considerada hasta el momento actual como el “gold standard” del diagnóstico de las lesiones preinvasivas del cérvix uterino. Por ello compararemos cada una de las técnicas con la histología.

Para determinar los valores de sensibilidad y especificidad se ha considerado como “end point” cualquier lesión igual o superior a CIN2+.

Dado que, como se ha mencionado anteriormente, las lesiones CIN3+ se consideran un “end point” más fiable también se han obtenido los datos excluyendo las lesiones CIN2.

Las lesiones CIN1 (y CIN2 si el “end point” es CIN3+) se han clasificado como “negativas para malignidad” para el cálculo de la especificidad.

### **Comparación de HC2 y hallazgos histológicos**

125 (61,57%) pacientes, del total de 203, presentaron una lesión CIN2+, de las cuales 121 (96,8%) tenían el test HC2 positivo. Ello supone una **sensibilidad (S)** del **96,8** (IC 95% [93,31-100,0]) y una **especificidad (E)** de **17,95** (IC 95% [8,79-27,11]) con una  $p=0,001$ . El **valor predictivo positivo**

(VPP) de este test es de **65,41** [58,28-72,53] y el **valor predictivo negativo** (VPN) de **77,78** [55,79-99,76].

4 casos de lesión CIN2+ (3,2%) no fueron detectadas por el test HC2.

Si excluimos los casos CIN2 y nos centramos en lesiones CIN3+ la **sensibilidad** es del **95,29** (IC [90,20-100] y la **especificidad** del **11,86** (IC [5,61-18,12]), (p=0,086). El **VPP** sería de **43,78** (IC [36,36-51,2]) y el **VPN** de **77,78** (IC [55,79-99,76]).

Aunque estos datos se analizarán en la discusión, conviene destacar en este punto que los datos de especificidad y VPN son poco valorables, dado que la población del estudio eran pacientes con alta sospecha de tener lesión y no se han cogido datos de población sana para poder comparar. Esto ocurrirá del mismo modo en el resto de técnicas diagnósticas.

### **Comparación de cobas 4800 y hallazgos histológicos**

Resultados muy similares a los previos se obtuvieron con el test cobas 4800, de modo que 120 (96%) de los 125 casos de CIN2+ fueron positivos al test, lo que supone una **sensibilidad** del **96,0** [92,16-99,84] La **especificidad** fue **15,38** [6,74-24,03]. El **VPP** del test fue **64,51** [57,37-71,66] y el **VPN** **70,58** [45,99-95,19] (p=0,016).

Si sólo consideramos como lesión los 85 casos de CIN3+ los datos son los siguientes: **S=95,29**[90,20-100,0]; **E=11,02** [4,94-17,09]; **VPP=43,55** [36,16-50,94]; **VPN=76,47** [53,37-99,58] (p=0,129).

### **Comparación de Linear Array y hallazgos histológicos**

De los 203 casos incluidos en el estudio 192 (94,58%) fueron positivos para uno o más de los 37 tipos virales que detecta el test de PCR denominado Linear Array.

De los casos con lesión (CIN2+=125 pacientes) 123 (98,4%) fueron positivos para Linear Array. Así pues la **sensibilidad** de este test es de **98,4** [95,80-100,0], y la **especificidad** de **11,54** [3,81-19,27]. Los valores **VPP** y



**VPN** fueron **64,06** [58,22-71,83] y **81,81** [54,48-100,0] respectivamente ( $p=0,007$ ).

Considerando los casos CIN2 como negativos los datos serían los siguientes: **S=97,65** [93,84-100,0]; **E=7,63** [2,41-12,84]; **VPP=43,23** [35,96-50,50]; **VPN=81,82** [54,48-100,0] ( $p=0,125$ ).

### **Comparación de APTIMA y hallazgos histológicos**

De las 166 (81,77%) pacientes con resultado positivo para APTIMA 116 (69,87%) tenían una lesión mayor o igual a CIN2. 37 (18,22%) pacientes en el estudio fueron negativas para APTIMA, de las cuales 9 (24,32%) tenían lesión. De esas 9 pacientes 3 (33,3%) tenían un CIN2.

La **sensibilidad** del test fue del **92,80** [87,87-97,73] y la **especificidad** del **35,90** [24,61-47,18]. Los **valores predictivo positivo y negativo** fueron de **69,87** [62,60-77,16] y **75,67** [60,5-90,85] respectivamente ( $p<0,0001$ ).

Al igual que en el análisis realizado con los otros test diagnósticos para valorar APTIMA también se han recalculado los valores de **sensibilidad, especificidad, VPP y VPN** sin las lesiones CIN2, obteniendo los siguientes resultados: **92,94** [86,91-98,97]; **26,27** [17,91-34,64]; **47,59** [39,69-55,49] y **83,78** [70,56-97,01] ( $p<0,0001$ ).

### **Comparación de la tinción p16INK4a y hallazgos histológicos**

De las 195 mujeres a las que se les realizó esta tinción (durante el diagnóstico o durante el tratamiento) 155 (79,49%) tuvieron la tinción p16 positiva, frente a un 20,51% de pacientes en las que la tinción fue negativa, o positiva focal/dudosa.

De esos 155 casos 117 (75,48%) correspondieron a lesiones CIN2+. Para este test se obtuvo por tanto una **sensibilidad** del **95,90** [91,97-99,83], con una **especificidad** de **47,94** [35,80-60,09]. El **VPP** fue **75,48** [68,39-82,58] y el **VPN** **87,50** [76,0-99,0] ( $p<0,0001$ ).

Si consideramos las lesiones CIN2 como “negativas” y optamos por CIN3+ como “end point” los valores obtenidos serían **S=96,39** [91,77-100,0]; **E=33,04** [23,88-42,19]; **VPP=51,61** [43,42-59,80]; **VPN 92,50** [83,09-100] ( $p<0,0001$ ).

A la vista de los datos podemos afirmar que los diferentes test diagnósticos estudiados tienen una **elevada sensibilidad** y una pobre especificidad. Los test con una **mayor especificidad son APTIMA y p16**. Estas conclusiones serán analizadas posteriormente en la discusión de este trabajo.

En la siguiente tabla (figura 58) se muestran los resultados de los test según hallazgo histológico. Para cada uno de los test se muestra el porcentaje de positividad según el hallazgo histológico.

**Figura 58. Tabla resultados de HC2, cobas 4800, Linear Array, APTIMA y p16INK4a en función de los hallazgos histológicos**

Variable	Resultado	Lesión % (n)				p (CIN2+/ CIN3+)*
		Negativa n=8	<CIN2 n=70	CIN2+ n=125	CIN3+ n=85	
HC2	Positivo	87,50 (7)	81,43 (57)	<b>96,80 (121)</b>	<b>95,29 (81)</b>	<0,0001
	Negativo	12,5 (1)	18,57 (13)	3,20 (4)	4,71 (4)	0,086
Cobas 4800	Positivo	87,50 (7)	84,29 (59)	<b>96,00 (120)</b>	<b>95,29 (81)</b>	0,011
	Negativo	12,50 (1)	15,71 (11)	4,00 (5)	4,71 (4)	0,129
Linear Array	Positivo	87,50 (7)	88,57 (62)	<b>98,40 (123)</b>	<b>97,65 (83)</b>	0,007
	Negativo	12,50 (1)	11,43 (8)	1,60 (2)	2,35 (2)	0,125
APTIMA	Positivo	75,00 (6)	62,86 (44)	<b>92,80 (116)</b>	<b>92,94 (79)</b>	<0,0001
	Negativo	25,00 (2)	37,14 (26)	7,20 (9)	7,06 (6)	<0,0001
p16INK4a	Positivo	37,50 (3)	53,85 (35)	<b>95,90 (117)</b>	<b>96,39 (80)</b>	<0,0001
	Negativo	62,50 (5)	46,15 (30)	4,10 (5)	3,61 (3)	<0,0001

\*Valor de “p” para end point CIN 2+ / valor de “p” para end point CIN 3+. Destacados en rojo los datos de sensibilidad (% de positividad) para cada test, tanto para CIN2+ como para CIN3+.

### **Comparación de APTIMA con hallazgos citológicos e histológicos**

Recordemos que según los hallazgos citológicos hemos clasificado las pacientes en tres grupos: **negativas para malignidad** (n=19; 9,41%), **lesiones de bajo grado** (n=90; 44,55%) y **lesiones de alto grado** (n=93; 46,04%).

De de las lesiones de alto grado el 90,32% presentan APTIMA positivo, y sólo un 9,68% tienen el test negativo.

De las lesiones de bajo grado el 74,44% tienen APTIMA positivo, y de las 19 citologías negativas para malignidad 15 (78,95%) también han resultado positivas para dicho test.

Si el “gold standard” fuese la citología (en lugar de la histología) la **sensibilidad** de APTIMA sería de **90,32** [83,78-96,87] y la **especificidad** de **24,77** [16,21-33,33] (p=0,013).

A su vez las pacientes con lesiones de bajo grado podemos subdividir las en ASCUS (n=19) y LSIL (n=71).

El 74,6% de las citologías LSIL y el 73,7% de las citologías ASCUS fueron positivas para APTIMA.

De las 19 pacientes (9,36%) con ASCUS el 68,42% (13 pacientes) tenían una lesión de alto grado en la biopsia, de las cuales el **100%** fueron **APTIMA-positivas**. De las 71 pacientes (35,15%) con LSIL el 33,8% (24 pacientes) tuvieron un resultado histológico HSIL, y de ellas el 87,5% (21 casos) tenían el test **APTIMA positivo**.

Así pues, vemos como en las mujeres con **citologías ASCUS y LSIL** que presentaban lesiones histológicas de alto grado el **test APTIMA** muestra porcentajes muy altos de positividad (100% y 87,5% respectivamente).

### **Comparación entre APTIMA, citología y hallazgos histológicos**

En este apartado se ha estudiado la relación entre APTIMA y los hallazgos tanto citológicos como histológicos en 202 mujeres (en una de las pacientes no se realizó citología previa al tratamiento).

Las pacientes **“sin lesión histológica”** fueron 8 (3,94%), de las cuales 4 (1,97% del total de las pacientes del estudio) presentaron una citología HSIL (lesión de alto grado), con APTIMA positiva en 3 (75%) de ellas.

De las 69 pacientes con **“lesiones de bajo grado”** (<CIN 2) 46 mujeres (66,67%) tenían una citología LSIL y 12 (17,39%) una citología HSIL. De las 46 mujeres con citología LSIL el 60,87% tenían APTIMA positivo. Y de las 12 con citología HSIL el 75% también fueron positivas para APTIMA.

125 mujeres (61,57%) tuvieron una **“lesión de alto grado”** histológica (CIN 2+). De ellas 77 (61,6%) presentaron una citología HSIL y 41 (32,80%) una citología LSIL. El porcentaje de positividad de APTIMA en esas pacientes fue del 93,51% en los casos de citología HSIL y del 90,24% en los de LSIL.

Ninguna de las pacientes con lesión de alto grado presentó una citología negativa con test APTIMA negativo. Sí hubo 7 pacientes con lesión de alto grado y citología negativa pero con test APTIMA positivo. Estas 7 pacientes (5,6% de todas las pacientes con lesión de alto grado) correspondería a casos de lesiones de alto grado que se perderían con la citología pero serían detectados por el test APTIMA.

Sin embargo 9 pacientes con APTIMA negativo tuvieron lesiones de alto grado, lo que supone un 7,2% del total de pacientes con lesión, y que representarían las pacientes “perdidas” por el test APTIMA (falsos negativos de la técnica).

De estas pacientes una presentó una infección por HPV 16, que sí fue detectado por los demás test (HC2, cobas 4800, Linear Array y tinción p16) y otro caso igualmente con HPV 16 positivo fue detectado por los demás test salvo HC2. Un caso con el tipo 33 y otro con el tipo 53 fueron detectados por todos los demás test. Otra paciente presentó un test Linear Array positivo para el tipo 73 y una tinción p16 positiva. Una paciente con virus 81 fue detectado por HC2 y Linear Array y otra paciente con infección por los tipos 83+53 fue detectada por Linear Array y tuvo una tinción positiva con p16. En un caso en el que sólo se detectó el tipo 6

todos los test fueron positivos salvo APTIMA. Cabe destacar un caso con una lesión CIN 3 en la que ninguno de los test resultó positivo.

En la siguiente tabla se representan las relaciones entre histología, APTIMA y citología (figura 59).

Se han recogido los datos para histología como “end point” tanto CIN 2+ como CIN 3+ (en este caso excluyendo las lesiones CIN 2 que pasan a considerarse como “lesiones de bajo grado”).

**Figura 59. Comparación entre Histología, APTIMA y citología**

Histología	APTIMA	Citología		
		Negativa %(n)	LSIL %(n)	HSIL %(n)
<b>Sin lesión n=8</b>	Positivo (n=6)	100,00 (1)	66,67 (2)	75,00 (3)
	Negativo (n=2)	0,00 (0)	33,33 (1)	25,00 (1)
<b>&lt;CIN 2 n=69</b>	Positivo (n=44)	63,64 (7)	60,87 (28)	75,00 (9)
	Negativo (n=25)	36,36 (4)	39,13 (18)	25,00 (3)
<b>CIN 2+ n=125</b>	Positivo (n=116)	<b>100,00 (7)</b>	<b>90,24 (37)</b>	<b>93,51 (72)</b>
	Negativo (n=9)	0,00 (0)	9,76 (4)	6,49 (5)
<b>CIN 3+ n=85</b>	Positivo (n=79)	<b>100,00 (5)</b>	<b>94,74 (18)</b>	<b>91,80 (56)</b>
	Negativo (n=6)	0,00 (0)	5,26 (1)	8,20 (5)

## 7. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO

Tras la intervención quirúrgica se realizó revisión en 199 casos (98%), en 134 pacientes en los 3-6 meses siguientes a la intervención y en el resto entre los 6 y 12 meses.

En los 199 casos (100% de las pacientes que acudieron a revisión) se realizó el test cobas 4800, y APTIMA, en 197 (98,99%) también el test HC2 y en 120 (60,30%) mujeres adicionalmente el test Linear Array.

149 casos fueron negativos para APTIMA (74,87%), frente a 50 (25,12%) que resultaron positivos. El test HC2 fue negativo en 125 (63,45%) y

positivo en 72 (36,55%), y el test Cobas 4800 negativo en 128 (64,32%) y positivo en 71 (35,68%).

De 120 pacientes a las que se realizó el test Linear Array 47 (39,17%) fueron negativas y 73 positivas (60,83%).

### **Comparación entre APTIMA e hibridación HC2 postquirúrgicas**

De las 197 pacientes a las que se les realizó el test HC2, en 125 (63,45%) fue negativo, de las cuales sólo dos casos (1,6%) eran positivos para APTIMA.

De las 72 (36,55%) mujeres con HC2 positivo el 66,67% lo fue también para APTIMA.

Se ha calculado el índice de concordancia **Kappa** entre los test APTIMA y HC2, obteniéndose un resultado de **0,69** (IC 95% [0,59-0,80]. La concordancia entre los dos test es buena, y superior a la obtenida prequirúrgicamente.

### **Comparación entre APTIMA y cobas 4800**

49 pacientes (24,62%) de las 199 estudiadas por cobas 4800 y APTIMA fueron positivas para ambos test, frente a 22 pacientes (35,67%) que fueron positivas para cobas 4800 pero no para APTIMA.

Sólo una paciente con APTIMA positivo era negativa para cobas 4800.

El índice de concordancia **Kappa** entre APTIMA y cobas 4800 tras el tratamiento quirúrgico fue **0,73** (IC [0,63-0,83].

### **Comparación entre APTIMA y Linear Array**

El test Linear Array se realizó en 120 pacientes, resultando positivo en 73 (60,83%) de ellas, de las que el 67,12% lo fueron también para APTIMA.

No hubo ningún caso con Linear Array negativo que resultase positivo para APTIMA.

El índice **Kappa** entre las dos técnicas fue **0,61** (IC [0,49-0,74], que vuelve a ser una buena concordancia.

En la siguiente tabla se muestran los datos comparativos de los 4 test realizados tras la cirugía.

**Figura 60. Relaciones entre test APTIMA y los test HC2, cobas 4800, y Linear Array (posterior a cirugía)**

Test	Resultado	APTIMA + % (n)	APTIMA – % (n)	p
HC2	Positivo	66,67 (48)	33,33 (24)	<0,0001
	Negativo	1,60 (2)	98,40 (123)	
Cobas 48	Positivo	69,01 (49)	30,99 (22)	<0,0001
	Negativo	0,78 (1)	99,22 (127)	
Linear Array	Positivo	67,12 (49)	32,88 (24)	<0,0001
	Negativo	0,00 (0)	100 (47)	

Si comparamos esta tabla con la que compara los diferentes test previos a la cirugía podemos observar que el **porcentaje de positivización de APTIMA en los casos en los que alguno de los demás test son positivos ha disminuido considerablemente tras el tratamiento quirúrgico ( $p<0,0001$ ).**

Resumiendo, la situación tras el tratamiento quirúrgico sería el siguiente: el 63,45% de las pacientes han resultado negativas para HC2, el 64,32% negativas para cobas 4800, y el 74,62% para APTIMA.

### **Relación entre APTIMA y tratamiento quirúrgico**

Recordemos que en este estudio 166 pacientes tenían el test APTIMA positivo previo a la cirugía, frente a 37 en las que el test era negativo (81,77% vs 18,23%).

Posteriormente al tratamiento quirúrgico, 50 casos fueron positivos para APTIMA frente a 149 negativos (25,13% vs 74,87%).

Por tanto el porcentaje de positivización tras la cirugía ha bajado de 81,77 a 25,13%. En **más de la mitad de los casos se ha negativizado el test APTIMA tras la cirugía.**

Los tratamientos llevados a cabo se distribuyeron del siguiente modo; a 126 pacientes (62,07%) se les realizó una conización +/- legrado endocervical, a 71 (34,97%) una electrocoagulación, y 6 pacientes (2,96%) fueron hysterectomizadas.

El porcentaje de pacientes negativas para APTIMA tras la cirugía fue 74,40% tras una conización, el 75,36% tras una electrocoagulación y 80% tras una hysterectomía.

Podemos afirmar que el **porcentaje de negativización de APTIMA es similar en todos los casos**, y por tanto **no se relaciona con el tipo de cirugía realizado (p=1,000).**

De las 203 pacientes intervenidas sólo 12 (5,91%) precisaron un estudio histológico en la revisión posterior al tratamiento por sospecha de lesión residual. Cuatro pacientes no se realizaron dicha revisión (1,97%).

Los resultados histológicos de las biopsias fueron los siguientes:

- Negativo para malignidad: 5 pacientes (41,66%)
- Lesión de bajo grado: 5 pacientes (41,66%)
- Lesión de alto grado: 2 pacientes (16,67%)



La tasa de **lesiones residuales** fue de un **3,5%**.

El test APTIMA tras la cirugía fue positivo para dos de las pacientes con biopsia negativa, una de las lesiones de bajo grado y en las dos pacientes con lesión de alto grado. Esto supondría que la **sensibilidad** y **especificidad** de **APTIMA** para el diagnóstico de **lesiones CIN 2+ residuales** tras el tratamiento quirúrgico sería **100%** (IC 95% [75,0-100,0]) y **70%** [36,6%-100,0%] respectivamente.

Si atendemos a los **bordes quirúrgicos**, en 16 pacientes (12,12% de las pacientes con conización o histerectomía) el informe anatomopatológico informó de bordes endocervicales afectados.

La afectación de bordes exocervicales no se ha considerado como bordes afectados, dado que la técnica quirúrgica empleada en nuestro Hospital asocia siempre una electrocoagulación de los bordes quirúrgicos, así como del lecho quirúrgico, lo que probablemente tenga relación con la baja tasa de lesiones residuales.

Conviene destacar en este punto que la valoración de los bordes sólo es posible en los casos de conizaciones cervicales o histerectomías (132 pacientes en total, es decir, en el 65,02%) y no así en los casos de electrocoagulación.

De los 16 casos con **bordes quirúrgicos afectados** sólo 4 (**25,0%**) tuvieron un test **APTIMA positivo** en la revisión. En 116 pacientes (87,88%) conizadas o histerectomizadas los bordes se informaron como **libres**, obteniendo un resultado positivo para **APTIMA** en 29 pacientes (**25,0%**), lo que supone un **resultado similar al de las pacientes con bordes afectados**.

Dos de los casos en los que se realizó biopsia durante la revisión posterior al tratamiento, por sospecha de lesión residual, pertenecían al grupo de bordes afectados, en uno el resultado de la biopsia fue una lesión de alto grado con test APTIMA positivo, y en el otro caso en la biopsia se objetivó una lesión de bajo grado con test APTIMA negativo.



# DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio ha sido **evaluar la eficacia diagnóstica del test APTIMA**.

Este test es capaz de detectar el RNA mensajero de los virus del papiloma humano de alto riesgo que codifica para las oncoproteínas E6 y E7, responsables del proceso de oncogénesis del cáncer de cérvix.

La intención de este trabajo es verificar si este test es válido como método de detección de las lesiones premalignas del cáncer de cuello uterino, y por tanto eficaz como método de screening.

Así mismo se ha pretendido comparar la eficacia del test APTIMA con otros métodos diagnósticos basados en la detección del DNA viral de HPV de alto riesgo, como son el test de hibridación HC2, y los métodos de PCR Linear Array y cobas 4800, así como correlacionar los resultados obtenidos por el test APTIMA y los encontrados con la tinción inmunohistoquímica p16INK4a.

La posible utilidad del test APTIMA en el manejo de las lesiones ASCUS/LSIL ha sido otro de los objetivos establecidos al inicio del estudio.

Finalmente, se ha propuesto estudiar si el test APTIMA es capaz de predecir la existencia de lesión residual tras el tratamiento de las lesiones premalignas del cérvix.

## 1. CONSIDERACIONES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO

La **edad media** de las pacientes de nuestro estudio ha sido de 35 años, con un rango comprendido entre los 19 y 66 años.

Esta edad media es similar a la encontrada en los diferentes estudios publicados sobre mujeres con lesiones premalignas del cérvix, que se sitúa entre los 27 y 47 años [116].

Del total de pacientes incluidas en este trabajo el 29,06% eran menores de 30 años, y el 70,94% restante de 30 o más años.

La edad media de la **menarquia** del grupo de pacientes estudiadas fue de 12,67 años, oscilando entre 8 y 17 años. Este dato tampoco difiere de los encontrados en diferentes publicaciones, que hablan de una edad media de menarquia de 12,5 años (10-15 años) [117].

El promedio de edad de inicio de relaciones sexuales se sitúa en este estudio a los 18,85 años, con extremos de 13 y 35 años.

El estudio **AFRODITA** [118, 119] es un estudio transversal de base poblacional, diseñado para estimar el grado de realización de la citología preventiva en España, así como la prevalencia de indicadores sociodemográficos, reproductivos, de conducta sexual y del conocimiento de la mujer sobre la infección por HPV, el cribado y el cáncer de cérvix. Según los resultados de este estudio aproximadamente un tercio de las mujeres estudiadas iniciaron sus relaciones sexuales entre los 19 y 21 años. La media de edad de la primera relación sexual es de 23,8 años en mujeres de 56 a 70 años, y de 18,2 en las mujeres de 18 a 25 años.

El porcentaje de pacientes que han cursado **estudios** superiores en este trabajo es del 43,48%. El Instituto Nacional de Estadística (INE), establece que en España, en el año 2012, el porcentaje de mujeres con nivel de estudios superiores entre 25 y 34 años es del 44,5%, bajando al 33,8% si consideramos a mujeres entre 25 y 64 años, y sólo un 16% si consideramos el grupo de edad de 55 a 64 años.

Diferentes estudios han indicado la relación entre el uso prolongado de **anticonceptivos hormonales** y el cáncer de cuello uterino. En nuestra serie el 33% de las mujeres estudiadas tomaban un anticonceptivo hormonal.

Según los resultados obtenidos en la encuesta **DAPHNE**, publicada en el año 2009, el porcentaje de mujeres que utilizaban anticonceptivos hormonales era un 20,3% en el año 2007, y un 17,9% en el año 2009 [120].

El porcentaje de mujeres **fumadoras** de nuestra serie es de un 33%. Diferentes publicaciones han relacionado la infección por HPV y el hábito

tabáquico con la aparición de lesiones precursoras y cáncer de cérvix. El tabaco tiene un efecto carcinogénico directo y produce una alteración de la inmunidad local en el cuello uterino, favoreciendo la cronificación de la infección por HPV.

La encuesta Europea de Salud en España en 2009, publicada por el INE, estima que la cifra de mujeres mayores de 16 años fumadoras es del 39,33%. Este dato es muy similar al encontrado en este trabajo.

Un 7,38% de la población estudiada presentaba algún **antecedente familiar** de neoplasia intraepitelial o cáncer de cérvix.

Se ha postulado en diferentes trabajos [111,112] que existen factores genéticos que podrían conferir una mayor susceptibilidad para padecer lesiones precursoras o cáncer de cuello uterino. **Mustelier** et al, estudiando los factores biológicos asociados a la aparición de citología alteradas realizó un estudio observacional y observó que las pacientes con citologías alteradas presentaban en el 14,8% de los casos antecedentes familiares de cáncer de cérvix, frente al 4,6% en las pacientes controles [121].

En una encuesta realizada en 2005 en España para el estudio de la epidemiología de las lesiones preinvasoras cervicales se incluyeron 14 laboratorios que habían estudiado un total de 409.443 muestras. El 3,56% de dichas citologías presentaba alguna alteración, siendo las más frecuente LSIL y ASCUS (**Vilaplana** et al. 2007). **Jones y Davis** en 2000 hablaban de un 5 a un 7% de citologías alteradas, y **Comino y Lubian** en 1996 reflejaron un amplio rango, entre 0,7 y 11,63%.

Si atendemos a los resultados de la encuesta española podemos concluir que la tasa de antecedentes familiares con lesiones precursoras o cáncer de cérvix mostrados en nuestro estudio es superior a la esperada en la población general, dada la incidencia de 3,56% de citologías anómalas en dicha población comunicada por Vilaplana en 2007.

Menos de la mitad de las mujeres estudiadas se habían realizado un **adecuado cribado de cáncer de cérvix** cuando fueron diagnosticadas de una lesión preinvasiva de cérvix.

El 80% de las mujeres españolas que desarrolla un cáncer de cérvix en nuestro país no se habían realizado un screening citológico adecuado.

En la encuesta realizada por **González y Castaño** en 2003 en el área 4 de Madrid, se observó que el 41,2% de las mujeres de entre 18 y 65 años no se había realizado nunca una citología, y que este porcentaje subía hasta el 59% en mujeres inmigrantes [122].

En cuanto a la **paridad** encontramos que más de la mitad (62,5%) de las mujeres de nuestra muestra eran nulíparas en el momento del estudio, mientras que un 23,1% habían tenido dos o más partos.

Las modificaciones hormonales del embarazo modulan la respuesta inmune a nivel local, y los cambios en cérvix provocados por el parto facilitan la ectopia cervical, favoreciendo la infección por HPV y su persistencia.

Ocho estudios de casos y controles sobre el carcinoma invasivo cervical, y dos sobre el carcinoma in situ del cérvix uterino, sugieren que las mujeres con tres o cuatro embarazos tienen un riesgo 2,6 veces superior de presentar un cáncer de cérvix que las nulíparas, y 7 o más partos aumentan el riesgo hasta 3,8 veces [123].

## 2. CONSIDERACIONES SOBRE LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

Para la realización de este estudio se ha elegido a pacientes que fueron referidas a la Unidad de Patología Cervical del nuestro Hospital para estudio por presentar una citología anómala, una infección por HPV, o sintomatología relacionada con patología cervical como coitorragias, etc, en definitiva por ser **susceptibles de presentar una lesión** precursora o cáncer de cérvix uterino, y que han sido tratadas mediante un tratamiento escisional o destructivo del cuello uterino.

El motivo de esta elección ha sido poder trabajar con pacientes que presentan **mayor prevalencia** de infección por tipos oncogénicos del virus de papiloma humano y de lesiones preinvasivas o invasivas de cérvix.

Este razonamiento es similar al planteado por **Ratnam** [124]. La mayoría de la bibliografía consultada para la discusión presenta como población de estudio pacientes referidas a colposcopia por el hallazgo de una citología anómala, como los de **Szarewski** [125,126], **Waldstrom** [127], **Stoler** [128], **Arbyn** [129] o **Mesher** [130]. Otros estudios han elegido la población general como objeto de estudio con la finalidad de realizar estudios de screening poblacional, como el de **Cuzick** [131] o el estudio **FASE** de **Monson** [132,133].

En nuestro estudio hemos encontrado pacientes con citología negativa en un 9,4%, con ASCUS otro 9,4%, LSIL en el 35% y HSIL en el 46%.

Si atendemos a los hallazgos histológicos, tomando como referencia el peor resultado entre la biopsia diagnóstica realizada en la consulta y la pieza quirúrgica resultado de la conización, encontramos 8 pacientes sin lesión (3,94%), 70 pacientes con lesiones de bajo grado o <CIN 2 (34,48%), y 125 (61,58%) pacientes con lesiones de alto grado o  $\geq$  CIN 2, también denominadas como CIN 2+ (85 pacientes, 41,87% del total, si consideramos sólo las pacientes CIN 3+).

El **resultado histológico ha sido considerado el “gold standard”** en el diagnóstico de las lesiones intraepiteliales del cérvix y del cáncer. Todos los test analizados en este trabajo tienen como finalidad el diagnóstico de este tipo de lesiones. Para calcular la sensibilidad y especificidad de cada uno de los métodos diagnósticos se ha considerado como “lesión” el resultado histológico  $\geq$  CIN 2, y como “negativo para malignidad” los casos <CIN 2. Estas consideraciones han sido concordantes con las encontradas en diferentes publicaciones [124].

Por otra parte, como se ha comentado anteriormente en los resultados, en los últimos años, se está reconsiderando si el **“end point”** debería ser CIN 2+, o por el contrario sería conveniente excluir los casos de CIN 2 (40 pacientes) y utilizar **CIN 3+** como “end point”. Ello es debido a la pobre reproducibilidad del diagnóstico CIN 2 y a la mayor probabilidad de regresión comparado con CIN 3. Por ello hemos decidido analizar los datos teniendo en cuenta ambos “end point”.

**Szarewski, Ratnam, Stoler, Arbyn o Waldstrom** son algunos de los autores que describen sus resultados para CIN2+ y para CIN3+.

**Waldstrom** realiza una comparación entre los test APTIMA y Linear Array para el triaje de citologías ASCUS, y encuentra una mayor sensibilidad para Linear Array cuando el end point utilizado es CIN 2+. Sin embargo para detectar CIN 3+ ambos test mostraban una sensibilidad similar [127].

### **3. CONSIDERACIONES SOBRE LA INFECCIÓN POR HPV Y TIPOS VIRALES**

El riesgo de desarrollar una lesión premaligna o cáncer de cérvix está relacionado con el tipo de HPV. La persistencia de la infección por virus de alto riesgo es requisito indispensable para la aparición de CIN 2-3 y cáncer.

Algunos estudios han calculado la duración media de la infección por virus del papiloma humano de alto y bajo riesgo. **Franco** (1999), estableció para los virus de alto riesgo una duración media de 13,5 meses, y de 8,2 meses para los de bajo riesgo [134]. **Muñoz** en el 2004 obtuvo resultados similares, encontrado una duración media de 14,8 meses para los HPV de alto riesgo, y de 11,1 para los de bajo riesgo [135].

**Khan** y colaboradores estudiaron la progresión a CIN 3 según el tipo de HPV de alto riesgo y observaron que existían diferencias en función del tipo viral. Así, partiendo de una citología negativa inicial, si la infección era por los tipos 16 ó 18, el 10% de las mujeres presentaban CIN 3 a los 3 años, y el 18-20% a los 10 años. Estas cifras fueron muy diferentes para otros tipos virales, situándose en torno al 3% [136].

Los HPV más frecuentemente identificados en nuestro estudio son, por orden de frecuencia, los tipos 16, 31, 66, 59, 73, 18, 58, 35, 51, 33, 52, 39, 56, 45, 67, 82 y 68.

En el meta-análisis de **Smith** [20], que incluyó 85 estudios publicados hasta febrero de 2002, con 10.058 casos de cáncer de cérvix, y que fue actualizado en el año 2006 [21] incluyéndose otros 14.500 casos de cáncer, los tipos de HPV más frecuentemente identificados, por orden de



frecuencia, fueron los tipos 16, 18, 33, 45, 31, 58, 52, 35, 59, 26, 39, 66, 73, 68 y 82.

El 37,44% de las pacientes incluidas en nuestro estudio presentaba una infección por HPV 16, y el 15,27% por HPV 31. Ambos tipos virales son igualmente los más frecuentes en las pacientes con lesiones CIN 2+. Estos datos son similares a los encontrados en la literatura [137].

En el caso del tipo 16 vemos que a medida que aumenta el grado de lesión histológica va aumentando la frecuencia de infección por dicho tipo viral, de modo que sólo encontramos dos pacientes sin lesión infectadas por este tipo frente a 17 pacientes con lesión <CIN2 y 57 pacientes con lesión CIN 2+. Esto es concordante con lo observado por otros autores.

**Andersson** y colaboradores en 2012 publicaron un trabajo donde se estudiaba la tendencia de 12 tipos de HPV de alto riesgo de expresar mRNA, en relación a la severidad de las lesiones estudiadas [137].

En total Andersson analizó 422 infecciones por HPV presentes en 245 muestras que pertenecían a mujeres con histología normal, varios grados de displasia o cáncer cervical, y determinó la presencia y tipos de HPV mediante test de DNA y mRNA (ambos con un test de PCR en tiempo real). Encontró que el 88% de las pacientes con DNA positivo con lesiones CIN 2+ expresaban mRNA, frente al 33% de pacientes con DNA positivo y citología normal.

En su estudio, el tipo viral que expresaba mRNA con mayor frecuencia era el 45, seguido del 16 y 31.

En el 52% de las muestras que presentaban infecciones múltiples (en las cuales la expresión de mRNA era más frecuente) más de un genotipo expresaba mRNA, y este fenómeno se observaba con mayor frecuencia conforme aumentaba la severidad de la lesión. Por ello concluye que las infecciones múltiples pueden tener implicaciones clínicas importantes.

En nuestro estudio, el test que permite estudiar la expresión de mRNA es el test APTIMA, que incluye una sonda de detección común para 14 tipos de alto riesgo, y no nos permite identificar cuál, o cuáles en el caso de infecciones múltiples, es el tipo responsables de la positivización del test.

Hemos obtenido un test APTIMA positivo en el 81,8% de las 203 muestras. Del total de casos, sólo 70 (34,5%) presentaron una infección simple, frente al resto en las que existía más de un tipo viral.

Uno de los propósitos de este trabajo ha sido estudiar la positivización de APTIMA según los tipos virales, con el objetivo de determinar si algunos tipos virales tienen mayor tendencia a expresar mRNA, y por tanto tendrían un mayor riesgo oncogénico.

A pesar de la limitación que supone no poder identificar en las infecciones múltiples cuál es el virus responsable de la positivización del test, si hemos observado una clara tendencia en determinados tipos virales de alto riesgo. Se han obtenido porcentajes de positivización de APTIMA de hasta el 100% en las infecciones en las que estaban presentes los tipos 31, 39, 45, 51, 52, 58, 68 y 82, aunque en este punto conviene destacar que la casuística en los dos últimos es de tan sólo 4 y 6 casos respectivamente. El porcentaje de positivización del HPV 16 fue del 86,84% y el del 18 del 88,89%. Similares porcentajes mostraron los tipos 33, 35, 59 y 66, y algo menores 56 y 73 (72,73% y 78,95% respectivamente).

Sería preciso realizar más estudios en este sentido, con una muestra mayor, y tal vez incluyendo test que permitan identificar individualmente los tipos virales que expresan mRNA, para confirmar estos resultados.

#### **4. CONSIDERACIONES SOBRE LOS TEST DIAGNÓSTICOS**

En este trabajo hemos utilizado diversos test de diagnóstico. Los test de Captura de híbridos (HC2), cobas 4800 y Linear Array detectan DNA viral de HPV de alto riesgo, mientras que el test APTIMA detecta RNA mensajero que codifica para las oncoproteínas virales E6/E7 de HPV de alto riesgo. A su vez, la tinción inmunohistoquímica p16INK4a permite detectar las células del epitelio cervical que presentan sobreexpresión de la proteína p16.

Existe una amplia información publicada sobre los diferentes test y su utilidad en el screening y el manejo de las lesiones preneoplásicas del cérvix uterino.

Numerosos estudios han demostrado que el **test de DNA de HPV** tiene una **mayor sensibilidad** (estadísticamente significativa) que la citología convencional para la detección de lesiones intraepiteliales de alto grado (CIN2 o peor) del cérvix [80, 81, 85, 138-140] y se recomienda su uso en el screening de cáncer de cérvix y en el manejo de las citologías con resultados denominado “borderline” (que incluyen las categorías LSIL y ASCUS) [141-143].

La primera generación de test aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) estaba constituida por test de detección de ácido desoxirribonucleico (**DNA**) de la mayoría (o todos) de los 14 tipos reconocidos de virus de papiloma humano de alto riesgo.

El test de **captura de híbridos HC2**, que detecta DNA viral de 13 tipos de alto riesgo es el test de detección de HPV mayoritariamente utilizado a nivel mundial. En 1998 **Lorincz** y colaboradores publicaron un estudio sobre esta técnica de detección de HPV [144].

Diferentes revisiones sistemáticas, como las de **Arbyn** y **Cuzick** [79, 145-146] y el estudio randomizado **ALTS** [147] han demostrado repetidamente la superioridad del test HC2 en el manejo de pacientes con ASCUS para detectar CIN 2+ comparado con la repetición de citologías. Sin embargo, para el triaje de citologías LSIL, este test no ha demostrado mejorar la sensibilidad y tienen una menor especificidad que la repetición de citologías [148,149].

Restringiendo el triaje con test de HPV de mujeres con LSIL a grupos de mayor edad se ha observado una mayor especificidad, dado que en estos grupos de edad la prevalencia de la infección por HPV es menor que en mujeres jóvenes, y la persistencia de la infección más frecuente conforme avanza la edad. Sin embargo no está claro cuál debería ser la edad punto de corte para utilizar el test de HPV en el manejo de citologías LSIL [150]. Como ejemplo, el estudio presentado por **Ronco** y colaboradores en Italia [151] comunicó una especificidad superior para el test HC2 como triaje de LSIL en mujeres entre 35 y 60 años (61%), que para el grupo de edad de 25 a 34 años (sólo un 31%). Por el contrario, una amplia base de datos en

EEUU publicada por **Castle** y colaboradores reveló datos de especificidad de tan sólo un 30% en mayores de 50 años [152].

Posteriormente a la aprobación por la FDA del test captura de híbridos HC2, otros test que detectan DNA se han ido incorporando a la batería de test diagnósticos utilizados en el screening de cáncer de cérvix como cobas 4800, Abott Real Time, BD HPV test o Linear Array.

A pesar de la utilidad de estos test por su elevada sensibilidad para la detección de las lesiones precancerígenas del cérvix, la falta de especificidad representa un verdadero problema. Esta **baja especificidad** es debida a la alta prevalencia y mayoritaria naturaleza transitoria de la infección por HPV. En el caso del test HC2 posiblemente también contribuya a reducir la especificidad la reactividad cruzada que se produce con tipos de HPV no oncogénicos diferentes a los 13 tipos virales que detecta dicho test, y así lo reflejaron **Castle** y **Poljak** en sus respectivos estudios [153,154].

Dado que el desarrollo del cáncer de cérvix, como ya se ha explicado anteriormente, depende de la actividad de las oncoproteínas virales E6 y E7, surgieron otros test, capaces de detectar **RNA mensajero** que codifica para esas oncoproteínas. Esos test serían potencialmente más específicos para la detección de enfermedad que los test de DNA [155].

**Castle** y colaboradores en 2007 publican un estudio con 540 pacientes sobre la utilidad de un “prototipo” de test que detecta mRNA E6/E7 (**APTIMA**) para la detección de lesiones precancerígenas y cáncer de cuello uterino. Los autores concluyeron que la probabilidad de que el test fuese positivo se incrementaba con la severidad de los hallazgos en citología e histología, además de presentar similar sensibilidad que la detección de DNA, y una mejor especificidad y valor predictivo positivo [156].

Tras esta publicación han surgido muchas otras que confirman la utilidad del test APTIMA para la detección de CIN 2+.

**Dockter** y colaboradores (EEUU) en 2009 compararon los test **APTIMA** y **HC2** para la detección de CIN 2+ y CIN 3+, en una muestra de 800 mujeres encontrando una sensibilidad y especificidad clínicas de 91% y 55% para

APTIMA y 95% y 47% para el test HC2 para detectar CIN 2+, y de 98% y 53% para APTIMA y 99% y 44% para HC2 para detectar CIN 3+. La sensibilidad clínica era similar para ambos test siendo la especificidad mejor para APTIMA, lo que podría mejorar el manejo del paciente y reducir costes sanitarios [157].

El test APTIMA ha sido estudiado por diversos autores con objeto de conocer su utilidad tanto en el screening como en el manejo de citologías anómalas, comparándolo a su vez con otros test diagnósticos.

En 2008, **Szarewski** (Reino Unido) [125] publicó un trabajo en el que participaron 953 mujeres referidas para colposcopia por un hallazgo citológico anómalo, y comparaba la sensibilidad y especificidad de siete técnicas diferentes para la detección de CIN de alto grado (**HC2, Amplicor, PreTect HPV-Proofer, APTIMA, Linear Array, Clinical-Arrays y CIntec p16INK4a**). Encontraron similar sensibilidad para todos los test, tanto en mujeres jóvenes (<30 años) como en mayores (≥30). Sin embargo la especificidad fue superior en el grupo de mayor edad para todas las técnicas. Cuatro test mostraron una sensibilidad superior al 95%. Los resultados de sensibilidad, de esos cuatro test, para la detección de CIN 2+ y CIN 3 + respectivamente fueron: Amplicor 98,9% y 99,5%, HC2 99,6% y 99,5%, Linear Array 98,2% y 99%, APTIMA 95,2% Y 97,4%. De los anteriores APTIMA fue el que mostró una mejor especificidad (42,2% y 38,8%). Y del total de test la mejor especificidad fue la del test PreTect HPV-Proofer (73,1% y 70,4%) pero con peor sensibilidad, al igual que el test CIntec p16INK4a, con el que se obtuvo una sensibilidad de 83,0% y 92,7% y una especificidad cercana a la de PreTect HPV-Proofer. Clinical Arrays mostró resultados algo más desfavorables a los presentados en otros estudios.

Este fue el primer estudio que comparó un amplio rango de test para la misma muestra de población.

En el 2012, el mismo grupo de autores publicaron un segundo artículo [126], con un mayor tamaño muestral y con algunas diferencias en cuanto a la edad de sus pacientes, ya que la proporción de mujeres menores de 30 años era mayor que en el estudio previo, lo que probablemente

provocara que la tasa de positividad de HPV y el número de casos CIN 2 fueran mayores, y la especificidad menor.

**Ruifang Wu**, del Hospital universitario Shenzhen de Peking, presentó en 2010 el estudio “The Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I” en el que se comparaba el test APTIMA con HC2 y la citología líquida, con la finalidad de comprobar si el test APTIMA era adecuado como técnica de screening del cáncer de cérvix. Incluyó un total de 2098 pacientes, que no habían acudido a ningún screening previamente, a las que realizó una citología, y los test HC2 y APTIMA. Obtuvo unos resultados de sensibilidad de 66,7%, 88,9% y 100% respectivamente, así como unos valores de especificidad de 95,5%, 84,5% y 91,2% respectivamente. Utilizaron como “end point” CIN 2+, dado el bajo número de casos CIN 3 o lesiones más graves [158].

También **Ratnam** (Canadá) [124] comparó las técnicas APTIMA y HC2 para el diagnóstico de lesiones CIN 2 + en 1418 mujeres que habían sido remitidas a colposcopia y en 1373 mujeres como parte del cribado rutinario. La sensibilidad y especificidad de APTIMA fue distinta en los dos grupos de mujeres, 96,3% y 43,2% respectivamente para el primer grupo de mujeres, y 100% y 88,3% para el segundo grupo (donde sólo hubo 7 casos de CIN 2+). En mujeres mayores de 30 años la especificidad fue de 93,9%. El acuerdo entre ambas técnicas fue bueno (kappa 0,75). Por otra parte, en 808 mujeres del grupo referido a colposcopia, se comparó el test APTIMA con otra técnica que detecta igualmente mRNA, el test Pretest Proofer, que detecta 5 tipos virales en contraposición a los 14 tipos que detecta APTIMA. La sensibilidad de APTIMA fue superior, sin embargo el test Pretest Proofer mostró una mejor especificidad.

En el año 2009 se publicaron las **guías para la validación** de nuevas técnicas de **detección de HPV** como método de **screening primario** de cáncer de cérvix [159]. En ellas se aconseja la elección de una cohorte representativa poblacional de mujeres de  $\geq 30$  años, y que la sensibilidad del nuevo test alcance al menos el 90% de la sensibilidad de HC2 y alcance una potencia estadística superior al 99% cuando se prueba en 100 casos de CIN 2+. En cuanto a la especificidad, las guías proponen que el valor de

especificidad del nuevo test sea al menos el 98% de la especificidad de HC2.

Teniendo en cuenta estas guías de validación, la conclusión de Ratnam en su estudio fue similar a la de otros autores; el test APTIMA, por su similar sensibilidad a HC2 pero mayor especificidad, es un test fiable para screening primario de cáncer de cérvix así como para el cribado de citologías alteradas.

La publicación de **Clad** y colaboradores (Alemania) en 2011 se sitúa en la misma línea [160]. Incluyó 424 pacientes que tenían una alteración citológica y comparó los test HC2 y APTIMA. Para el tipado de muestras positivas utilizó el test Linear Array. La sensibilidad de APTIMA para la detección de CIN 2+ y CIN 3+ fue 91,7% y 98,2% respectivamente. La especificidad para CIN 2+ y CIN 3+ fue 75,0% y 56,3%. La sensibilidad fue similar a la de HC2 y la especificidad superior.

**Ovestad y Vennestrom** (Noruega) en 2011 realizan una comparación entre diferentes test comerciales (Amplicor, cobas 4800, PreTect HPV-Proofer, Linear Array y APTIMA) utilizados en el seguimiento de 528 pacientes con citologías ASCUS/LSIL [161].

La sensibilidad de Amplicor, cobas 4800 y APTIMA para detectar CIN 2-3 fue muy alta (96-100%), frente a la de PreTect HPV-Proofer, que fue tan sólo de un 70%. El acuerdo entre Amplicor y cobas 4800 fue casi perfecto (kappa 0,85), entre Amplicor y Proofer bajo (kappa 0,33), y bueno entre Amplicor y APTIMA (kappa 0,74). El índice kappa entre Cobas 4800 y APTIMA fue 0,81 (concordancia muy buena), y entre APTIMA y Proofer la concordancia fue moderada (kappa 0,41). Realizando la comparación con Linear Array el acuerdo fue casi perfecto con Amplicor, cobas 4800 y APTIMA (kappa 0,93, 0,94 y 0,82 respectivamente), pero moderado con Proofer (kappa 0,60). Otra conclusión a la que llegó este estudio es que ninguno de los test predijo la regresión de las lesiones CIN 2-3.

Entre los estudios que se han publicado sobre la posible utilidad de APTIMA como **screening primario** uno de los más importantes es el denominado “**the FASE study**” (French APTIMA screening evaluation), publicado por **Monsonogo** (Francia) y colaboradores en 2010 (con nuevos

datos publicados en 2012) [132,133]. Se trata de un estudio multicéntrico con 5006 mujeres de entre 20 y 65 años, dentro de un contexto de cribado.

Al igual que otros estudios la sensibilidad de APTIMA y HC2 (92,0% y 96,7%, para la detección de CIN 2+, y 95,7% y 95,3% para CIN 3+) fue superior a la de la citología (69,1% para CIN 2 + y 73,3% para CIN 3+).

La sensibilidad de ambos test fue similar, sin embargo la especificidad de APTIMA fue superior a la de HC2, por lo que los autores concluyen que el test de mRNA APTIMA podría ser considerado como una opción para el screening rutinario en mujeres por encima de 20 años.

En el intervalo entre la publicación de 2010 y de 2012 del estudio FASE el test APTIMA recibió la **aprobación por la FDA** (octubre 2011) como método de screening asociado a la citología a partir de los 30 años, y como manejo de las citologías ASCUS. En la segunda publicación Monsonego y colaboradores ampliaron los datos del estudio, aportando datos de genotipado (con una técnica de PCR en tiempo real que detectaba 14 tipos de HPV de alto riesgo y 2 de bajo riesgo) y llegando a concluir que APTIMA detecta un 5% y un 15% más de CIN 2+ y CIN 3+ respectivamente en comparación con la citología, que es superior a HC2 cuando el end point es CIN 2+ (no así en CIN 3+, donde la diferencia no fue estadísticamente significativa), y que es el test diagnóstico con mejor balance entre sensibilidad y especificidad cuando tomamos como referencia la citología líquida.

Otro de los estudios cuyo objetivo fue estudiar APTIMA como método de screening fue el de **Cuzick** y colaboradores (Reino Unido) en 2013 [131]. En este trabajo se incluyeron 6000 mujeres a las que se les realizó un screening rutinario. Además de una citología líquida se llevaron a cabo los test Hybrid Capture 2 (HC2), cobas 4800, Abbott RealTime, BD HPV test, PreTect Proofer, y APTIMA.

El porcentaje de citologías anómalas fue de un 5,3% y la positividad de los test de DNA se situó entre un 13,4% y un 16,3%. La positividad de APTIMA fue significativamente menor (10,3% de todas las mujeres).



Los autores encontraron una alta concordancia entre los test cobas 4800, Abbot RealTime y BD HPV test, con valores de kappa superiores a 0,8. Igualmente los valores de kappa fueron altos al comparar los test de DNA con el test APTIMA, no así con el test PreTect Proofer, donde la correlación fue menor. La sensibilidad se calculó sólo con la población con citologías anómalas que precisaban estudio por colposcopia, por lo que es posible que no se diagnosticasen lesiones en mujeres con citologías normales o borderline (ASCUS/LSIL). Los datos de sensibilidad y especificidad de los test fueron cercanos al 100% para CIN 3+ en el caso de BD HPV, cobas, HC2 y APTIMA, y del 94% y 68,8% en el caso de Aboott RealTime y PreTect Proofer respectivamente. El test más específico fue APTIMA, resultado concordante con los datos encontrados en la literatura. Hay que tener en cuenta que en este estudio sólo se diagnosticaron 40 casos de CIN 2+. La importancia de este trabajo es que compara seis técnicas diferentes de diagnóstico en el contexto de screening.

Otros estudios, sin embargo, han tenido como objetivo el manejo de las citologías con anomalías de bajo grado, también denominadas por algunos autores “borderline”. En este tipo de citologías se encontrarían las categorías **ASCUS y LSIL**.

**Waldstrom y Ornskov** (Dinamarca) en 2011 publicaron un estudio en el que comparaban el test de DNA Linear Array y el test APTIMA en el triage de citologías con “atipia de células escamosas de significado incierto” (ASCUS) [127]. Se seleccionaron 369 pacientes, mayores de 30 años, con citología ASCUS y se les realizó ambos test. Linear Array y APTIMA fueron positivos en el 44,3% y 31,7% de los casos respectivamente. Los dos test mostraron idéntica sensibilidad para la detección de CIN 3+ (92,6%), pero el test de mRNA mostró una mejor especificidad (73,8% vs 60,1%). Usando CIN 2+ como gold standard la sensibilidad de Linear Array fue algo superior (93,8% vs 87,5%), pero se encontró mejor especificidad para APTIMA (78,0% vs 64,3%). La concordancia entre ambos test fue  $k=0,61$ , considerando Linear Array como positivo sólo cuando detectaba alguno de los 14 tipos identificados por APTIMA.

En el estudio de **Gravitti** y colaboradores, en el que se incluyeron 3000 mujeres del estudio **ALTS** (EEUU) con citología ASCUS, y comparaba las

técnicas Linear Array con captura de híbridos 2, encontró una sensibilidad para la técnica Linear Array de 93,3% para la detección de CIN 3+, y una especificidad de 48,1%, lo que implicaba cifras de sensibilidad similares a HC2 pero una especificidad ligeramente menor [162].

El **meta-análisis de Arbyn** (Bélgica, 2012) incluye 8 estudios que comparan la técnica HC2 y APTIMA para el manejo de citologías **ASCUS/LSIL** [129]. Szarewski 2008, Dockter 2009, Clad 2011, Cuschieri 2010, Wu 2010, CLEAR 2011, Monsonego 2011 y Ratnam 2011, fueron los estudios incluidos. Entre todos ellos se reunieron 1839 casos de ASCUS y 1887 casos de LSIL. De media, APTIMA fue tan sensible como HC2 pero más específico.

Los valores medios de sensibilidad para la detección en CIN 2+ y CIN 3+ en el grupo ASCUS fueron 95,7% y 96,2% respectivamente para APTIMA, y 93,8% y 95,% respectivamente para HC2.

En el grupo LSIL los valores de sensibilidad para CIN 2+ y CIN 3+ fueron 91,0% y 96,7% respectivamente para APTIMA, y 95,5% y 98,8% para HC2.

En cuanto a la especificidad, los valores medios para la detección de CIN 2+ y CIN 3+ en el grupo ASCUS fueron 56,4% y 54,9% para APTIMA respectivamente, y 46,8% y 44,9% para HC2.

En el grupo LSIL, APTIMA tuvo una especificidad de 42,5% y 38,7% para la detección de CIN 2+ y CIN 3+ respectivamente, y HC2 28,6% y 27,8%.

A la vista de los datos, los autores del meta-análisis concluyen que APTIMA es un test con mejor especificidad tanto en el grupo ASCUS como en el grupo LSIL, sin perder sensibilidad respecto al test HC2, y que podría utilizarse tanto en el manejo de ASCUS como en el de LSIL.

El estudio prospectivo multicéntrico **CLEAR** [128], publicado por **Stoler** y colaboradores en EEUU en 2013, compara APTIMA y HC2 en el manejo de ASCUS. Incluyó 939 mujeres  $\geq 21$  años con citologías ASCUS. La sensibilidad y especificidad del test mRNA para la detección de CIN 2+ fue 86,8% y 62,9% respectivamente y para CIN 3+ 90,2% y 60,2%. En consonancia con los estudios previamente publicados, el estudio CLEAR encuentra una sensibilidad para APTIMA similar a HC2 con una especificidad significativamente mayor para la detección de CIN 2+.

Incluido en el grupo de estudios sobre la utilidad de APTIMA en el manejo de anomalías citológicas se encuentra el del grupo de **Mesher** y colaboradores (Reino Unido) [130], que compara 7 técnicas diferentes, entre las que se encuentran técnicas de DNA (HC2, Abbott RealTime, BD HPV test y cobas 4800), técnicas de RNA (PreTect HPV-Proofer y APTIMA) y la técnica CINtec p16INK4a. Fueron estudiadas 1228 pacientes con anomalías citológicas de bajo grado. Cinco test obtuvieron una sensibilidad de 99% o superior para la detección de CIN 3+: HC2, Abbott RealTime, BD HPV, cobas 4800 y APTIMA. Dichos test fueron más sensibles que p16INK4a o PreTect HPV-Proofer, pero tuvieron una menor especificidad para <CIN 2 (entre 23,3% y 34,7%). Hubo una alta concordancia entre Abbott RealTime, BD HPV y cobas 4800, con valores de kappa superiores a 0,85 en comparaciones pareadas. El acuerdo entre estos test y APTIMA y HC2 también fue bueno (kappa entre 0,63 y 0,77). El acuerdo fue menor con PreTect HPV-Proofer y p16INK4a. Los valores de kappa para todos los test para el tipo 16 fue alto (kappa superior a 0,8).

Recientemente se ha publicado el estudio de **Rijkaart** y colaboradores (2012) comparando catorce estrategias diferentes de cribado para las mujeres con DNA HPV positivo, mediante combinaciones de citología y test de HPV. El triaje de mujeres HPV-positivas mediante citología, seguida de repetición de citología mostró el valor predictivo más alto con una tasa de referencia a colposcopia moderada. Este estudio permite comparaciones directas de los diferentes test y de las combinaciones entre ellos en un contexto de cribado [163].

Una de las últimas técnicas de diagnóstico introducidas en la práctica clínica ha sido la **tinción inmunohistoquímica/inmunocitológica p16INK4a**, que se basa en la detección de la sobreexpresión de p16 en las células cervicales. La detección puede realizarse tanto en muestras citológicas como en histológicas.

Para mejorar las limitaciones de la tinción con hematoxilina-eosina, se ha ido introduciendo de manera progresiva la tinción inmunohistoquímica p16INK4a en el procesamiento anatomopatológico de las muestras histológicas, con el fin de mejorar la precisión en el diagnóstico de la patología cervical, especialmente en casos de CIN 2, donde con frecuencia

existe mayor imprecisión diagnóstica, como explica en su estudio **Bergeron** [97].

**Zhang** [164] estudió el impacto que supone introducir la tinción p16 para precisar mejor el “gold standard” y “end point” de los test diagnósticos en los estudios sobre screening de cáncer de cérvix, y demostró que la sensibilidad de los test de HPV y la citología mejoraban si se utilizaba el “end point” modificado (CIN 2+/p16INK4a +)

Dado que la tinción p16 a nivel histológico y citológico están estrechamente correlacionados, ya que se basan en el mismo principio molecular, el biomarcador p16 usado en la citología podría ser un test útil en el screening del cáncer de cérvix.

Ya hemos visto algunos estudios donde se compara la realización de p16 en citología (CINtec p16INK4a) con técnicas de detección de DNA o RNA viral, como Szarewski [125] o Mesher [130].

**Tsompou** y colaboradores [165] examinaron en un meta-análisis 61 estudios que evaluaron la presencia de p16 tanto en citologías como en muestras histológicas. La expresión detectable de p16 se asociaba a un aumento de la severidad de la displasia. Entre las citologías normales encontraron un 12% de positividad para p16. Un 45% de las citologías ASCUS, un 45% de citologías LSIL y el 89% de HSIL expresaban p16. La tendencia fue similar en las muestras histológicas. El 2% de las biopsias negativas para malignidad, el 38% de CIN 1, el 68% de CIN 2 y el 82% de CIN 3 tuvieron una tinción p16-positiva. Concluyeron que aunque los datos eran prometedores el uso actual de p16 era limitado, debido al amplio rango de positividad, fundamentalmente en lesiones de bajo grado, que varían entre un 10 y el 100% para citologías ASCUS y entre un 10 a un 86% en el caso de biopsias CIN 1.

Un trabajo publicado en 2010 por **Reuschenbach y Clad** (Alemania) estudió la realización de CINtec, APTIMA y HC2 en mujeres con resultados anómalos en el screening [166]. Incluyeron 275 casos de citologías anómalas, a las que se les realizó las 3 técnicas diagnósticas, añadiendo a todas las muestras histológicas la tinción inmunohistoquímica p16 además de la ya clásica tinción con hematoxilina-eosina. Obtuvieron valores de

sensibilidad para la detección de CIN 2+ de 91,5% para HC2, 88,4% para APTIMA, y 86,6% para CINtec, y para la detección de CIN 3+ 96,4% para HC2 y 95,5% para APTIMA y CINtec. La especificidad fue superior para CINtec (74,8% para CIN 2 + y 60,6% para CIN 3+) respecto a HC2 (63,4% para CIN 2+ y 49,1% para CIN 3+) y APTIMA (71,2% para CIN 2+ y 56,4% para CIN 3+). En cuanto al grado de acuerdo, el mejor fue entre HC2 y APTIMA ( $\kappa=0,73$ ). El grado de concordancia entre CINtec y APTIMA fue de 0,56, y entre HC2 y CINtec de 0,51.

Los **datos de sensibilidad de nuestro trabajo** para la detección de CIN 2+ y de CIN 3 + respectivamente fueron: HC2 96,80% y 95,29%, cobas 4800 96,0% y 95,29%, Linear Array 98,4% y 97,65%, APTIMA 92,80% y 92,94%, y tinción p16INK4a 95,9% y 96,39%.

Así pues Linear Array fue el test con mejor sensibilidad para detectar lesiones CIN 2+ ( $p=0,007$ ), y APTIMA el que obtuvo peor sensibilidad para la detección de dichas lesiones ( $p<0,0001$ ).

Estos valores son similares a los descritos por otros autores.

Si el “gold standard” fuese la citología (en lugar de la histología) la **sensibilidad** de APTIMA en nuestro trabajo sería de **90,32%** y la **especificidad** de **24,77%**.

Ninguna de las pacientes con lesión de alto grado presentó una citología negativa con test APTIMA negativo. Esto significa que si combinásemos ambas técnicas (citología y APTIMA) en el screening del cáncer de cérvix la sensibilidad para la detección de lesiones CIN 2+ se acercaría al 100%.

Un **5,6%** de las pacientes con lesión de alto grado (7 casos) correspondieron a casos de **lesiones de alto grado que se perderían con la citología pero serían detectados por el test APTIMA**.

Sin embargo 9 pacientes con APTIMA negativo tuvieron lesiones de alto grado, lo que supone un **7,2%** del total de **pacientes con lesión**, y que representarían los **falsos negativos del test APTIMA**.

Estos casos “perdidos” correspondieron a dos casos de CIN 2, 4 de CIN 3, y un caso de VAIN III. De todos ellos 8 mostraron un resultado positivo para Linear Array y sólo uno resultó negativo para este test (teniendo en cuenta que dentro de las técnicas que detectan HPV el test Linear Array podría considerarse el “gold standard”). El test HC2 fue positivo en 5 de esos casos, e igualmente el test cobas 4800 fue positivo en 5 casos de lesiones CIN 2+ no detectadas por APTIMA. La tinción p16INK4a resultó positiva en 7 casos, negativa en otra y no se realizó en una de estas pacientes. Un caso con lesión CIN 3 presentó todos los test diagnósticos negativos, presentando igualmente una tinción p16 negativa.

Es posible que estos casos correspondan a infecciones que no han expresado mRNA E6/E7, a pesar de la presencia de un virus de alto riesgo y de infecciones persistentes. De hecho, se ha observado en algunos estudios, como el de **Cuschieri** en el 2004, que no todos los HPV de alto riesgo detectados por test de DNA expresan mRNA [167].

Y por otra parte hay que tener en cuenta que dos de los casos no detectados por APTIMA eran lesiones CIN 2, y como ya se ha mencionado previamente este tipo de lesiones tienen una posibilidad de regresión mayor a las lesiones CIN 3+, y una menor reproducibilidad, por lo que es posible que en este caso se tratase de lesiones CIN 2 transitorias sin capacidad de progresión.

Los **datos de especificidad** también han sido calculados, aunque hay que tener en cuenta el importante sesgo de nuestra población, dado que la muestra poblacional estudiada es mayoritariamente población enferma, es decir, con lesiones preneoplásicas o cáncer de cérvix, y sólo un pequeño porcentaje de las pacientes no presentaban lesión histológicamente confirmada. Aún así es conveniente destacar en este punto que de todos los test APTIMA y la tinción p16INK4a fueron los que presentaron una especificidad claramente superior al resto (siendo estos resultados estadísticamente significativos), en consonancia con las conclusiones de otros autores.

La especificidad para CIN 2+ y CIN 3+ es la siguiente: HC2 17,95% y 11,86%, cobas 4800 15,38% y 11,02%, Linear Array 11,54% y 7,63%, APTIMA 35,90% y 26,27%, y tinción p16INK4a 47,94% y 33,04%.

En cuanto a **citologías ASCUS/LSIL**, los datos obtenidos en nuestro trabajo son los siguientes: el 74,6% de las citologías LSIL y el 73,7% de las citologías ASCUS fueron positivas para APTIMA.

De las 19 pacientes (9,36%) con **ASCUS** el 68,42% (13 pacientes) tenían una lesión de alto grado en la biopsia (CIN 2+), y de éstas el **100%** fueron **APTIMA-positivas**. Esto significa que todas las pacientes con lesiones CIN2+ que habían presentado una citología ASCUS fueron detectadas por el test APTIMA.

De los 71 casos (35,15%) con **LSIL** el 33,8% (24 casos) tuvieron un resultado histológico CIN 2+, de los que el **87,5%** (21 casos) tenían el test **APTIMA positivo**. Al igual que en el caso de citologías ASCUS, la mayoría de las pacientes que presentaron una citología LSIL con lesión histológica de alto grado fueron detectadas por APTIMA.

Así pues, vemos como en las mujeres con **citologías ASCUS y LSIL** que presentaban lesiones histológicas de alto grado el **test APTIMA** muestra una sensibilidad de 100% y 87,5% respectivamente. Esto concuerda igualmente con los datos presentados previamente, como los publicados el **meta-análisis de Arbyn** [129]. Por ello este test podría ser útil en el manejo de las citologías ASCUS y LSIL.

En **nuestro trabajo el índice de concordancia (kappa)** entre APTIMA y los test HC2, cobas 4800, Linear Array y tinción p16 fue respectivamente **0,56, 0,54, 0,41 y 0,43**. Estos datos son inferiores a los publicados en el trabajo noruego, o a los encontrados por Cuzick [131].

Hay que tener en cuenta en este punto, las características de la población de nuestro estudio, que no pertenece a un contexto de screening, sino a población enferma, lo que podría explicar las diferencias encontradas.

## 5. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS TRAS EL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

Sobre la **revisión** tras el tratamiento quirúrgico, hay que resaltar que en la mayoría de los casos ésta ha tenido lugar entre los 3 y 6 meses posteriores al tratamiento, y no a partir de los 6 meses, como suele realizarse en la mayoría de los centros hospitalarios.

Dado que actualmente uno de los **factores pronósticos** más importantes para la evolución de las pacientes tratadas por una lesión preneoplásica cervical es la **negativización viral**, se está empezando a cuestionar cuál es el momento real de negativización del virus tras la cirugía. Así, un grupo de investigadores del Hospital Clinic de Barcelona está llevando a cabo en la actualidad un estudio en el que se recogen muestras para analizar HPV en el propio acto quirúrgico. Posiblemente los datos obtenidos en este estudio podrán ayudar a entender mejor el proceso de negativización del HPV tras el tratamiento del CIN, y permita establecer con mayor precisión el momento adecuado para la realización del primer control postquirúrgico.

Por otra parte, en el momento actual, con las técnicas de diagnóstico viral disponibles, no es posible discernir entre una infección viral antigua y una reciente, por lo que la existencia de uno o más tipos virales a los seis meses de la cirugía no indicaría obligatoriamente una persistencia viral, aunque si el tipado muestra los mismos tipos virales la probabilidad de que sea una persistencia lógicamente será alta. Tampoco se puede pasar por alto el reinicio de las relaciones sexuales y por tanto la posibilidad de reinfecciones por virus presentes en la pareja sexual de la paciente.

En nuestro estudio el porcentaje de positividad de APTIMA tras el tratamiento ha bajado de 81,77% a 25,13%, el de HC2 de 91,13% al 36,55%, y el de cobas 4800 de 91,63% a 35,68%. Así pues las tres técnicas muestran un **porcentaje de negativización similar** (56,64%, 54,58% y 55,95% respectivamente) siendo estos resultados estadísticamente significativos para APTIMA ( $p=0,017$ ) y cobas 4800 ( $p=0,024$ ), y en el límite de la significación estadística para HC2 ( $p=0,052$ ).



Al analizar los índices de concordancia **tras el tratamiento** quirúrgico observamos que los valores de kappa se modificaron con respecto a los iniciales, objetivándose un mayor acuerdo entre APTIMA y HC2, APTIMA y Cobas 4800, y APTIMA y Linear Array, tras el tratamiento de las lesiones, siendo los valores **0,69, 0,73 y 0,61** respectivamente.

Revisando la literatura existente al respecto, no se han encontrado trabajos en los que conste la comparación de esos tres test diagnósticos de HPV tras el tratamiento de las lesiones premalignas del cérvix uterino.

Sí existen estudios donde se valora la utilidad de diferentes biomarcadores tras el tratamiento de lesiones CIN, como el de **Valasoulis** y colaboradores (Grecia) publicado en 2010 [168]. En este estudio se evaluaron varios biomarcadores pasados 6 meses del tratamiento, para valorar la utilidad de dichos biomarcadores para predecir la existencia de lesión residual o recurrente. Se evaluaron los test Clinical Arrays HPV (DNA), NASBA (mRNA), OncoTect (citometría de flujo, mRNA) y CINTec.

La probabilidad de negativización de todos los biomarcadores tras el tratamiento fue estadísticamente significativa, excepto para el test de DNA cuando éste era positivo para alguno de los tipos de alto riesgo diferente a los tipos 16 ó 18.

Los resultados preoperatorios de los biomarcadores no fueron capaces de predecir los resultados postoperatorios. Y el uso del preservativo fue el principal factor predictivo a los 6 meses del tratamiento, ya que parecía reducir el riesgo de presentar positividad para alguno de los biomarcadores incluidos en el estudio.

No encontraron relación entre el estatus de los márgenes quirúrgicos y la positividad de los biomarcadores tras el tratamiento, probablemente por la práctica de electrocoagulación rutinaria tras la conización, con la teórica eliminación completa de la lesión.

**Tropé y Jonassen** (2011) realizaron en Noruega un trabajo con 613 mujeres conizadas por presentar una lesión CIN 2+, para estudiar la utilidad del test PreTect HPV-Proofer (mRNA) en la predicción de lesión residual tras la conización. Obtuvieron una sensibilidad de dicho test de

45,5% para detectar CIN 2+ residual, concluyendo que el test PreTect HPV-Proofer no parecía a corto plazo un método adecuado para la detección de lesión residual CIN 2+ tras el tratamiento [169].

En nuestro trabajo es difícil realizar una valoración de la utilidad de los diferentes test estudiados para la **predicción de lesión residual**, ya que de las 203 pacientes intervenidas sólo 12 (5,91%) precisaron un estudio histológico en la revisión posterior al tratamiento por sospecha de lesión residual. Por otra parte no se ha incluido en el estudio los datos del seguimiento posterior al primer control postoperatorio, por lo que no se puede descartar la existencia de lesiones residuales que pudieran ser diagnosticadas más allá de los primeros 6 meses.

De las pacientes con estudio histológico posterior al tratamiento 5 pacientes (41,66%) presentaron una lesión de bajo grado y otras dos (16,67%) una lesión de alto grado. En el resto (41,66%) la biopsia fue negativa para malignidad.

La tasa de **lesiones residuales** (CIN 2+) fue un **3,5%**, lo que supone una tasa algo inferior a la encontrada en otros trabajos, como la tasa publicada en el trabajo de Valasoulis que fue 4,2% [168], o la tasa de 6,4% en el de Tropé [169]. Esta diferencia podría deberse a la técnica quirúrgica empleada en nuestro centro, que incluye la electrocoagulación sistemática del lecho y los bordes quirúrgicos.

El test APTIMA tras la cirugía fue positivo para dos de las pacientes con biopsia negativa, una de las lesiones de bajo grado y en las dos pacientes con lesión de alto grado, por lo que podemos afirmar que la **sensibilidad y especificidad** de APTIMA para diagnosticar lesión residual CIN 2+ es del **100% y 70%** respectivamente, teniendo en cuenta la limitación que supone el escaso número de casos para calcular estos valores.

# CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas de este trabajo son las siguientes:

1. Se han obtenido **altos valores de sensibilidad** de HC2, cobas 4800, Linear Array, APTIMA y tinción inmunohistoquímica p16INK4a para la detección de CIN 2+ (96,80%, 96,0%, 98,40%, 92,80% y 95,90% respectivamente). Los resultados han sido estadísticamente significativos con  $p < 0,0001$  para APTIMA y Linear Array,  $p = 0,001$  para HC2 y  $p = 0,007$  para cobas 4800. Estos datos confirman la utilidad de todos estos test en el screening del cáncer de cérvix.
2. Los datos de especificidad también han sido calculados, obteniendo una especificidad claramente superior para el test APTIMA con respecto a los demás test diagnósticos y siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ).
3. Con respecto a las citologías **ASCUS/LSIL**, el test APTIMA ha demostrado en nuestro estudio valores de sensibilidad muy buenos que han alcanzado significación estadística, fundamentalmente para ASCUS, y mejor especificidad que otros test, lo que indica que este test puede ser útil en el manejo de estos hallazgos histológicos, que suponen casi el 3% de todas las citologías realizadas en nuestro medio.
4. Se han calculado los **índices de concordancia** entre las diferentes pruebas diagnósticas, previamente al tratamiento quirúrgico y posteriormente. Los valores Kappa han sido significativamente mejores después del tratamiento.
5. Las tasas de **negativización del test APTIMA** postquirúrgicas han sido similares para los diferentes tratamientos realizados conización, electrocoagulación o histerectomía.

6. Las técnicas HC2, cobas 4800 y APTIMA mostraron **porcentajes de negativización similares** tras el tratamiento quirúrgico (56,64%, 54,58% y 55,95% respectivamente) siendo estos resultados estadísticamente significativos para APTIMA ( $p=0,017$ ) y cobas 4800 ( $p=0,024$ ), y en el límite de la significación estadística para HC2 ( $p=0,052$ ).
7. La sensibilidad de APTIMA para detectar **lesión residual** ha sido del 100% en este trabajo, lo que nos permitiría afirmar que este test podría predecir la existencia de lesiones residuales. Aunque esta aseveración estaría limitada por el escaso número de casos con lesiones residuales postquirúrgicas encontradas.
8. Se han obtenido datos estadísticamente significativos al comparar APTIMA y determinados tipos de HPV de alto riesgo presentes en la muestra, en concreto para los tipos 31 ( $p=0,002$ ), 51 ( $p=0,046$ ) y 58 ( $p=0,048$ ). Esto supone que el test APTIMA sería capaz de identificar algunos tipos virales con mayor capacidad para sobreexpresar las oncoproteínas E6 y E7.

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review 1975-2006. National Cancer Institute. 2009.
- [2] World Health Organization International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN database 2002. CANCER Mondial. 2002.
- [3] García M, Jemal A, Ward E, Center M, Hao Y, Seigel R, et al. Global cancer facts and figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2007.
- [4] Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase No, version 2.0. Lyon: IARC Press. 2004.
- [5] Arbyn M, Raifu AO, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004. *Annals Oncol.* 2007;18:1708-15.
- [6] Varela Lema L, Queiro Verdes T. Detección de los oncogenes E6/E7 para el diagnóstico precoz de cáncer de cuello de útero. Santiago de Compostela: Consellería de Sanidade, Axencia de Avaliación de Tecnoloxías Sanitarias de Galicia, avalia-t; 2010. Serie Avaliación de Tecnoloxías. Consultas técnicas: CT2010/01.
- [7] Arbyn M, Autier P, Ferlay J. Burden of cervical cancer in the 27 member states for the European Union: estimates for 2004. *Annals Oncol.* 2007;18:1423-5.
- [8] Mortalidad por cáncer y otras causas en España. Año 2006. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología [Internet]. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2005 [citado 7 ago 2009]. Disponible en: <http://www.isciii.es/htdocs/pdf/mort2006.pdf>
- [9] Rodríguez-Rieiro, Cristina; Aragonés, Nuria; Pollan, Marina; López-Abente, Gonzalo; Pérez-Gómez, Beatriz. Evolución de la mortalidad por cáncer de cérvix por regiones en España entre 1975 y 2004. *Med Clin (Barc).* 2009;133:41-6.

[10] Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. *Eur J Cancer*. 2009;45:2640-8.

[11] Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. Bethesda (MD); National Cancer Institute; 2009 [citado 7 ago 2009]. Disponible en: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006/browse\\_csr.php](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/browse_csr.php)

[12] Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Arnold K, Marchesi F, Capocaccia R, et al. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009;45:931-91.

[13] Gondos A, Chokunonga E, Brenner H, Parkin DM, Sankila R, Borok MZ, et al. Cancer survival in southern African urban population. *Int J Cancer*. 2004;112:860-4.

[14] Verdecchia A, Guzzinati S, Francisci S, De Angelis R, Bray F, Allemani C, et al. Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. *Eur j Cancer* 2009;45:1042-66.

[15] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189 (1):12-19.

[16] Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basics studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5);342-350.

[17] Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:3-13.

[18] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-527.

[19] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomavirus. *Virology*. 2004;324:17-27.

- [20] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a metaanalysis. *Br J Cancer*. 2003;88(1):63-73.
- [21] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical cancer lesions: a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 2007;121(3):621-32.
- [22] WHO/ICO Information Center on HPV and Cervical Cancer. [www.who.int/hpvcenter](http://www.who.int/hpvcenter) 2009 Update.
- [23] Cortés Bordoy JC, García de Paredes M, Muñoz Zato M, Martínón Torres F, Torné Blade A, García Rojas A, et al. Vacunas profilácticas frente al virus del papiloma humano: documento de consenso 2008. *Semergen*. 2009;35(1):20-8.
- [24] Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005;2005(Suppl 1):S16-24.
- [25] Muñoz N, Castellsagué X, Berrington de González A, Gissman L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24S3.
- [26] Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review. *Cell*. 2000;100:57-70.
- [27] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
- [28] Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:839-849.
- [29] Pietras K, Östman A. Hallmarks of Cancer: Interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res*. 2010 Mar 5. [Epub ahead of print].
- [30] Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. The state or the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jul 1;88(13):5523-7.

- [31] Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*. 2009 Jan 5;383(1):69-77.
- [32] Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseliov F, Eienkel J, Hoeckel M, von Knebel Doeberitz M. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*. 2003; 22:3977-3984.
- [33] Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Ghei T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes*. 2009 Oct 17.
- [34] McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. Review. *Virus Res*. 2009;145:195-208.
- [35] Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1991;88:571-574.
- [36] Um SJ, Lee SY, Kim EJ, Myoung J, Namkoong SE, Park JS. Down-regulation of human papillomavirus E6/E7 oncogene by arsenic trioxide in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2002.
- [37] Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*. 2006 Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.
- [38] Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, Morales J, Guillen D, Sherman ME, Solomon D, Schiffman M. Proyecto Epidemiológico Guanacaste (PEG) Group. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ*. 2009 Jul 28;339:b2569.
- [39] Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985 Mar 7-13;314(6006):111-4.



- [40] Pfister H, Gissman L. Heterogeneity of human papilloma viruses. *Bull Cancer*. 1978;65(2):165-7.
- [41] De Villiers EM, Wagner D, Schneider A, Wesch H, Miklaw H, Wharendorf J, Papendick U, zur Hausen H. Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet*. 1987 Sep 26;2(8561):703-6.
- [42] De Villiers EM; Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324:17-27.27/34)
- [43] Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny and taxonomy. *J Virol*. 1995;69(5):3074-83.
- [44] Commission of the European Communities. Recomendación del Consejo sobre el Cribado del Cáncer de 2 de diciembre 2003 (2003/878/CE). *Diario Oficial de la Unión Europea* (L327/34).
- [45] Ronco G, Anttila A. Cervical cancer screening in Europe: changes over the last 9 years. *Eur J Cancer*. 2009;45:2629-31.
- [46] Christopherson WM, Scott MA. Trends in mortality from uterine cancer in relation to mass screening. *Acta Cytol*. 1977 Jan-Feb;21(1):5-9.
- [47] Goldie SJ, Kim JJ, Myers E. Coste-efectividad del cribado del cáncer de cuello uterino. *Vaccine* 2006;24:S3/179-S3/187.
- [48] Cortés J. Estrategias de cribado del cáncer de cuello uterino. *Prog Obstet Ginecol* 2005;58 Supl 1:228-30.
- [49] Anttila A, Ronco G, Working Group on the Registration and Monitoring of Cervical Cancer Screening Programmes in the European Union; within the European Network for Information on Cancer (EUNICE). Description of the national situation of cervical cancer screening in the member states of the European Union. *European Journal of Cancer*. 2009;45:2685-2708.
- [50] Puig-Tintoré LM, Castellsagué X, Torné A, de Sanjosé S, Cortés J, Roura E, et al. Coverage and factors associated with cervical with cervical

cancer screening: results from the Afrodita study: a population-based survey in Spain. J Low Genit Tract Dis. 2008;12(2):82-9.

[51] IARC International Agency for Research on Cancer (2005). Cervix Cancer Screening. IARC Handbooks of Cancer Prevention, vol 10. IARCPress, Lyon.

[52] McCrory DC, Matchar D, MD. Evaluation of Cervical Cytology. Evidence Reports/Technology Assessments, No. 5. Report No.:99-E010. Agency for Health Care Policy and Research (US). Rockville (MD), February 1999. (Publicado en la web. Consultado Enero 2011) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32961/>

[53] Peto J. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. Lancet. 2004;364:249-56.

[54] Kim JJ. Cost-effectiveness of organized versus opportunistic cervical cytology screening in Hong-Kong. J Public Health. 2004;26:130-7.

[55] Bos AB. Non attendance is still the main limitation for the effectiveness of screening for cervical cancer in The Netherlands. Int J Cancer. 2006;119:2372-75.

[56] Brinkmann D. Why do women still develop cancer of cervix despite the existence of a national screening programme? Eur L Obstet Gynecol Reprod Biol. 2005;119:123-24.

[57] De Sanjosé S. Historia de cribado en mujeres con cáncer infiltrante de cuello uterino. Gaceta Sanitaria. 2006;20:166-70.

[58] Cuzick J, Clavel C, Petry KU et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. Int J Cancer. 2006;119:1095-1101.

[59] Mateu Aragonés JM. Valoración crítica: Asociación de técnicas diagnósticas. Mateu Aragonés JM. Atlas de Colposcopia, Cap 10. Ed. JIMS, Barcelona 1973. (ISBN: 84-7092-074-X).

- [60] Visioli CB, Zappa M, Ciatto S, Iossa A, Crocetti E. Increasing trends of cervical adenocarcinoma incidence in Central Italy despite extensive screening programme 1985-2000. *Cancer Detect Prev*. 2004;28:461-4.
- [61] Vinh-Hung V, Bourgain C, Vlastos G, Cserni G, De Ridder M, Storme G, Vlastos AT. Prognostic value of histopathology and trends in cervical cancer: a SEER population study. *BMC Cancer*. 2007;7:164-77.
- [62] Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG, Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2008;111:167-77.
- [63] Vilaplana E, Puig-Tintoré LM, Cortés X. Resultados citológicos anormales. Encuesta española. *Boletín de la AEPCC*. 2006;20:10.
- [64] Castellsagué X, Rémy V, Puig-Tintoré LM, de la Cuesta RS, González-Rojas N, Cohet C. Epidemiology and cost of screening and management of precancerous lesions of the cervix in Spain. *J Low Genit Tract Dis*. 2009 Jan;13(1):38-45.
- [65] Schiffman MH, Kiviat NB, Burk RD, Shah KV, Daniel RW, Lewis R, Kuypers J, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, et al. Accuracy and interlaboratory reliability of human papillomavirus DNA testing by hybrid capture. *J Clin Microbiol*. 1995 Mar;33(3):545-50.
- [66] Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P. Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer*. 1999 Jul;80(9):1306-11.
- [67] Castle PE, Wacholder S, Sherman ME, Lorincz AT, Glass AG, Scott DR, Rush BB, Demuth F, Schiffman M. Absolute risk of a subsequent abnormal pap among oncogenic human papillomavirus DNA-positive, cytologically negative women. *Cancer*. 2002 Nov 15;95(10):2145-51.
- [68] Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos MM. Genital human papillomavirus infection in female

university students as determined by a PCR-based method. JAMA. 1991 Jan 23-30;265(4):472-7.

[69] Klug SJ, Molijn A, Schopp B, Holz B, Iftner A, Quint W, JF Snijders P, Petry KU, Krüger Kjaer S, Munk C, Iftner T. Comparison of the performance of different HPV genotyping methods for detecting genital HPV types. J Med Virol. 2008 Jul;80(7):1264-74.

[70] Castle PE, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Wacholder S, Burk RD, Manos MM, Schussler JE, Macomber P, Schiffman M. Comparison between prototype hybrid capture 3 and hybrid capture 2 human papillomavirus DNA assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer. J Clin Microbiol. 2003 Sep 4;41(9):4022-30.

[71] Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, Franco E. Use of PGMV primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):902-7.

[72] de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3'ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol. 1995 Apr;76(Pt 4):1057-62.

[73] Snijders PJF, van den Brule AJC, Meijer CJLM. The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. J Pathol. 2003;201:1-6.

[74] De Francesco MA, Gargiulo F, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Manca N. Comparison of the AMPLICOR human papillomavirus test and the hybrid capture 2 assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. J Virol Methods. 2008;147:10-7.

[75] Snadri MT, Lentani P, Benini E, Dell'Orto P, Zorzino L, Carozzi FM et al. Comparison of the digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. J Clin Microbiol. 2006;44:2141-2146.

- [76] Monsonego J, Bohbot JM, Ollini G, Krawec C, Vincent C, Merignargues I et al. Performance of the Roche AMPLICOR HPV test in prediction of cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal PAP smear. *Gynecol Oncol.* 2005;99:160-168.
- [77] Van Ham MA, Bakkers JM, Harbers GK, Quint WG, Massuger L, Melchers W. Comparison of two commercial assays for detection of HPV in cervical scrape specimens: validation of the Roche Amplicor HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with higher risk of cervical disorders. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2662-2667.
- [78] Giuliani L, Coletti A, Syrjänen K, Favalli C, Ciotti M. Comparison of DNA sequencing and Roche Linear array in human papillomavirus (HPV) genotyping. *Anticancer Res.* 2006;26:3939-3941.
- [79] Cuzick J, Arbyn M, Rengaswamy S et al. Overview of Human Papillomavirus-Based and Other Novel Options for Cervical Cancer Screening in developed and developing Countries. *Vaccine.* 2008;26S:29-41.
- [80] Mayrand MH, Duarte-Franco E, Mansour N et al. Human Papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1579-1588.
- [81] Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F et al. Results at recruitment from a randomized controlled trial comparing human papillomavirus testing alone with conventional cytology as the primary cervical cancer screening test. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:492-501.
- [82] Kahn MJ, Castle PF, Lorincz AT, Wacholder S, et al. The elevated 10-year risk of cervical pre-cancer and cancer in women with HPV type 16 or 18 and possible utility of type. Specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1072-9.
- [83] Puig-Tintoré LM, Cortés X, Castellsague X, Torné A, Ordi J, de Sanjosé S, et al. Prevención del cáncer de cuello uterino ante la vacunación frente al virus del papiloma humano. *Prog Obstet Ginecol.* 2006;49(2):5-62.

- [84] Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ*. 2008;337:a1754.
- [85] Bulkmands NWJ, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJP, Bulk S, et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5 years follow-up of a randomized controlled implementation trial. *The Lancet*. 2007;370:9601.
- [86] Kitchener HC, Almonte M, Thomson C, Wheeler P, Sargent A, Stoykova B, et al. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomized controlled trial. *Lancet Oncol*. 2009;10(7):672-82.
- [87] Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Malila N, Tarkanen J, Laurila P, Anttila A. Age-Specific Evaluation of Primary Human Papillomavirus Screening vs Conventional Cytology in a Randomized Setting. *J Nat Cancer Inst*. 2009;101:1612-23.
- [88] Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Lancet Oncol*. 2010 Mar;11(3):249-57.
- [89] Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. 2<sup>a</sup> ed. Luxemburg. Office for official publications of the European Communities. 2008.
- [90] Castells X, Sala M, Ascunce N, Salas D, Zubizarreta R, Casamitjana M, et al. Descripción del cribado de cáncer en España. Proyecto DESCRIC. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques de Catalunya. 2007. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, AATRM núm. 2006/01.
- [91] Franco EL, Tsu V, Herrero R, Lazcano-Ponce E, Hildesheim A, Muñoz N, Murillo R, Sánchez GI, Andrus JK. Integration of human papillomavirus

vaccination and cervical cancer screening in Latin America and The Caribbean. Review. Vaccine. 2008 Aug 19;26 Suppl 11:L88-95.

[92] Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. Virus Genes. 2009 Oct 17.

[93] Nakagawa S, Yoshikawa H, Yasugi T, Kimura M, Kawana K, Matsumoto K, et al. Ubiquitous presence of E6 and E7 transcripts in human papillomavirus-positive cervical carcinomas regardless of its type. J Med Virol. 2000;62(2):251-8.

[94] Kraus I, Molden T, Holm R, Lie AK, Karlsen F, Kristensen GB, et al. Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33 and 45 in the majority of cervical carcinomas. J Clin Microbiol. 2006;44(4):1310-7.

[95] Halfon P, Benmoura D, Agostini A, Khiri H, Martineau A, Penaranda G, Blanc B. Relevance of HPV mRNA detection in a population of ASCUS plus women using the NucliSENS EasyQ®HPV assay. J Clin Virol. 2009 Dec 18.

[96] Ordi J, García S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, Torné A. p16INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. Int J Gynecol Pathol. 2009;28:90-7.

[97] Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R. European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosis high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Clin Pathol. 2010 Mar;133(3):395-406.

[98] Denton K, Bergeron C, Klement P, Trunk MJ, Keller T, Riddeer R; European CINtec Cytology Study Group. The sensitivity and specificity of p16INK4a Cytology versus HPV Testing for Detecting High-Grade Cervical Disease in the Triage of ASC-US and LSIL Pap Cytology Results. Am J Clin Pathol. 2010 Jul;134(1):12-21.

[99] Villaplana E, Puig-Tintoré LM, Cortés X. Resultados Citológicos Anormales. Encuesta Española. Boletín AEPCC. 2006;20:10.

- [100] Ikenberg H, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bergeron C, et al. Utility of p16/Ki-67 dual stained cytology in detecting high-grade disease in primary cervical cancer screening and in Management of Pap cytology abnormalities: Results from the PALMS trial. Submitted.
- [101] Huang TH, Lai HC, Liu HW, Lin CJ, Wang KH, Ding DC, Chu TY. Quantitative Analysis of Methylation Status of the AX1 Gene for Detection of Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2010 May;20(4):513-519.
- [102] Hung-Cheng L, Ya-Wen L, Tim HM. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 2008 April;123(1):161-167.
- [103] Wentzensen N, Mark E, Sherman MS, Wang S. Utility of Methylation Markers in Cervical Cancer Early Detection: Appraisal of the State-of-the-Science. *Gynecol Oncol*. 2009 Feb;112(2):293-299.
- [104] Ferlay F, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAM 2002: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base Nº 5. Version 2.0. Lyon: IARC Press. 2004-2005.
- [105] Clifford GM et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: apooled analysis. *Lancet*. 2005;366(9490):991-8.
- [106] Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis-role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):20-8.
- [107] Reguero Hernández E. La infección por papilomavirus y su relación con el cáncer cervico-uterino. Trabajo presentado en el XVIII Forum Nacional de Ciencias Médicas. 2006.
- [108] Fournier Segarra D. Medios diagnósticos en la detección precoz del cáncer cervicouterino.[Citado23abril2008]Disponible en <http://www.forunestudiantil.sld.cu/salones-virtuales/revisiones-bibliograficas/medios-diagnosticos-en-la-deteccion-precoz-del-cancer-cervicouterino.doc/download>.



- [109] Szarewski A, Cuzick J. Smoking and cervical neoplasia a review of the evidence. *J Epidemiol Biostat.* 1998;3:229-256.
- [110] Plummer M et al. Smoking and cervical cancer: pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Cancer Causes and Control.* 2003;14(9):805-14.
- [111] Hildesheim A, Wang S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Research.* 2002;89:229-240.
- [112] Horn LCh, Raptis G, Fischer U. Familiar cancer history in patients with carcinoma of the cervix uteri. *Eur J of Obstet and Gynecol and Reprod Biol.* 2002;101:54-57.
- [113] Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System terminology for reporting results of cervical cytologú. *JAMA.* 2002;287:2114-9.
- [114] Rijkaart DC, Coupe VM, van Kemenade FJ, Heideman DA, Hasselink AT, Verweij W, et al. Comparison of hybrid capture 2 testing at different thresholds with cytology as primary cervical screening test. *Br J Cancer.* 2010;103:939-46.
- [115] Carreon JD, Sherman ME, Guillen D et al. CIN2 is a much less reproducible and less valid diagnosis than CIN3: results from a histological review of population-based cervical samples. *Int J Gynecol Pathol.* 2007;26:441-6.
- [116] Ghaem-Maghami S, Majeed G, Soutter WP. Incomplete excision of cervical intraepithelial neoplásica and risk of treatment failure: a meta-analysis s.l. *Lancet Oncol.* 2007;8:985-93.
- [117] Temboursy Molina MC. Desarrollo puberal normal. Pubertad precoz. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2009;11 Supl16:127-142.
- [118] De Sanjose S, Cortés X, Méndez C, Puig.Tintoré L, Torné A. Age at sexual initiation and number of sexual partners in the female Spanish population Results from the AFRODITA survey. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;140(2):234-240.

[119] Bosch FX, Castellsagué X, Cortés J, Puig-Tintoré LM, Roura E et al. Estudio AFRODITA. Cribado del cáncer de cuello uterino en España y factores relacionados. s.l. GSK Eds. 2009. ISBN: 978-84-691-8490-S.

[120] PHARMA. 6ª Encuesta DAPHNE-BAYER SHERING. Hábitos anticonceptivos de la mujer en España. 2009.

[121] Mustelier R, Ardines I, García AJ. Algunos factores biológicos asociados con la aparición de citologías alteradas. Rev Cubana Obstet Ginecol. 1999;25(1):14-8.

[122] González Rubio Y, Castaño Pinto MS. Estudio descriptivo del cribado del cáncer de cérvix en nuestro centro de salud. No captamos a la población de riesgo. MEDIFAM. 2003;13(2):85-91.

[123] Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, et al. Role of parity and human Papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. Lancet. 2002;359:1093-101.

[124] Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, et al. Aptima HPV E6/E7 mRNA Test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. J Clin Microbiol. 2011;49:557-564.

[125] Szarewski A, Laurence A, Cadman L, Austin J, Ho L, et al. Comparison of Predictors for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17(11):3033-42.

[126] Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Adhdow-Barr L, et al. Comparison of Seven Test for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears: the Predictors 2 Study. J Clin Microbiol. 2012;50:1867-1873.

[127] Waldstrom M, Ornskov D. Comparison of the clinical performance of an HPV mRNA test and an HPV DNA test in triage of atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). Cytopathology. 2010;23:389-395.

[128] Stoler MH, Thomas C, Wright Jr MD, Cuzick J, et al. APTIMA HPV assay performance in women with atypical squamous cells of

undetermined significance cytology results. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208:144.e1-8.

[129] Arbyn M, Roelens J, Cuschieri K, Cuzick J, Szarewski A, Ratnam S, et al. The APTIMA HPV assay versus the Hybrid Capture 2 test in triage with ASC-US or LSIL cervical cytology: A meta-analysis of the diagnostic accuracy. *Int J Cancer*. 2013;132:101-108.

[130] Mesher D, Szarewski A, Cadman L, Austin J, Ashdow-Barr L et al. Comparison of human Papillomavirus testing strategies for triage of women referred with low-grade cytological abnormalities. *European Journal of Cancer*. 2013;49:2179-2186.

[131] Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. Comparing the performance of six human Papillomavirus test in a screening population. *British Journal of Cancer*. 2013;8:908-913.

[132] Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, et al. Evaluation of oncogenic human Papillomavirus RNA and DNA test with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *Int J Cancer*. 2011;129:691-701.

[133] Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC et al. Risk assessment and clinical impact of liquid-based cytology, oncogenic human Papillomavirus (HPV) DNA and mRNA testing in primary cervical cancer screening (The FASE Study). *Gynecologic Oncology*. 2012;125:175-180.

[134] Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human Papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999;180:1415-23.

[135] Muñoz N, Méndez F, Posso H, Molano M, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human Papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis*. 2004;190:2077-87.

[136] Kanh MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, et al. The elevated 10-year risk of cervical pre-cancer and cancer in women with HPV type 16 or

18 and possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. J Nat Cancer Inst. 2005;97:1072-9.

[137] Andersson E, Kärnberg C, Radberg T, Blomqvist L, Zetterqvist BM, Ryd W et al. Type-dependent E6/E7 mRNA expression of single and multiple high-risk human Papillomavirus infections in cervical neoplasia. Journal of Clinical Virology. 2012;54:61-65.

[138] Anttila A, et al. Rate of cervical cancer, severe intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma in situ in primary HPV DNA screening with cytology triage: randomized study within organized screening programme. BMJ. 2010;340:c1804.

[139] Koliopoulos G, et al. Diagnostic accuracy of human Papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. Gynecol Oncol. 2007;104:232-246.

[140] Naucier P, et al. Human Papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. N Engl J Med. 2007;357:1589-1597.

[141] Saslow D, et al. American Cancer Society guideline for the early detection of cervical neoplasia and cancer. CA cancer J Clin. 2002;52:342-362.

[142] Wright TC, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical cancer screening test. Am J Obstet Gynecol. 2007;197:346-355.

[143] Wright TC, et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. Am J Obstet Gynecol. 2007;197:340-345.

[144] Lorincz AT. Hybrid capture. Clin Chem. 1998;44:1363.

[145] Arbyn M, Buntix F, Van Ranst M, et al. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst. 2004;96:280-93.

- [146] Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, et al. Chapter 9: Clinical applications of HPV testing: a summary of meta-analyses. *Vaccine*. 2006;24(3):S78-S89.
- [147] ASCUS-LSIL Triage Study Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:1383-92.
- [148] ASCUS-LSIS Triage Study Group. A randomized trial on the management of low-grade squamous intraepithelial lesion cytology interpretations. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:1393-400.
- [149] Arbyn M, Parakevaidis E, Martin-Hirsch P, et al. Clinical utility if HPV DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN. An update of pooled evidence. *Gynecol Oncol*. 2005;99(3):7-11.
- [150] Arbyn M, Martin-Hirsch P, Buntix F, et al. Triage of women with equivocal or low-grade cervical cytology results. A meta-analysis of the HPV test positivity rate. *J Cell Mol Med*. 2009;13:648-59.
- [151] Ronco G, Cuzick J, Segnan N, et al. HPV triage for low-grade (L-SIL) cytology is appropriate for women over 35 in mass cervical cancer screening using liquid based cytology. *Eur J Cancer*. 2007;43:476-80.
- [152] Castle PE, Fetterman B, Thomas CJ, et al. The age-specific relationships of abnormal cytology and human Papillomavirus DNA results to the risk of cervical precancer and cancer. *Obstet Gynecol*. 2010;116:76-84.
- [153] Castle PE, et al. Human Papillomavirus genotype specificity of Hybrid Capture 2. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2595-2604.
- [154] Poljak M, Marin J, Seme K, Vince A. Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol*. 2002;25:89-97.
- [155] Cuschieri K, Wentzensen N. Human Papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:2536-45.

- [156] Castle PE, Dockter J, Giachetti C, García F, et al. A cross-sectional Study of a Prototype Carcinogenic Human Papillomavirus E6/E7 Messenger RNA Assay for Detection of Cervical Precancer and Cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2599-2605.
- [157] Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonego J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol.* 2009;45:55-61.
- [158] Wu R, Belinson SE, Du H, Na W, et al. Human Papillomavirus Messenger RNA Assay for Cervical Cancer Screening, The Shenzhen Cervical Cancer Screening Trial I. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;8:1411-14.
- [159] Meijer CJ, et al. Guidelines for human Papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009;124:516-520.
- [160] Clad A, Reuschenbach M, Weinschenk J, et al. Performance of the Aptima High-Risk Human Papillomavirus mRNA Assay in a Referral Population in Comparison with Hybrid Capture 2 and Cytology. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):1071-1076.
- [161] Ovestad I, Vennestrom U, Andersen L, Gudlaugsson E, et al. Comparison of different commercial methods for HPV detection in follow-up cytology after ASCUL/LSIL, prediction of CIN2-3 in follow-up biopsies and spontaneous regression of CIN2-3. *Gynecol Oncol.* 2011;123:278-283.
- [162] Gravitti PE, Schiffman M, Solomon D, Wheeler CM, Castle PE. A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human Papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:1248-54.
- [163] Rijkaart C, Berkhof J, van Kemenade FJ, et al. Evaluation of 14 triage strategies for HPV DNA-positive women in population-based cervical screening. *Int J Cancer.* 2012;130(3):602-610.
- [164] Zhang Q, Kuhn L, Denny LA et al. Impact of utilizing p16INK4a immunohistochemistry on estimated performance of three cervical cancer screening test. *Int J Cancer.* 2007;120:351-6.

- [165] Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:210-220.
- [165] Reuschenbach M, Clad A et al. Performance of p16INK4a-cytology, HPV mRNA, and HPV DNA testing to identify high grade cervical dysplasia in women with abnormal screening results. *Gynecol Oncol.* 2010;119:98-105.
- [167] Cuschieri K, Whitley M, Cubie H. Human Papillomavirus type specific DNA and RNA persistence: implications for cervical disease progression and monitoring. *J Med Virol.* 2004;73:65-70.
- [168] Valasoulis G, Koliopoulos G, Founta C, et al. Alterations in human Papillomavirus-related biomarkers after treatment of cervical intraepithelial neoplásica. *Gynecol Oncol.* 2010;121:43-48.
- [169] Tropé A, Jonassen CM, Sjoborg K, Nygard M, et al. Role of high-risk human Papillomavirus (HPV) mRNA testing in the prediction of residual disease after conisation for high-grade cervical intraepithelial neoplásica. *Gynecol Oncol.* 2011;123:257-262.